

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EP04/1405

REC'D 24 JUN 2004

WIPO PCT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 13 795.5

**Anmeldetag:** 20. März 2003

**Anmelder/Inhaber:** SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT  
Mannheim/Ochsenfurt, 68165 Mannheim/DE

**Bezeichnung:** Veränderte PPase-Expression in Zuckerrübe

**IPC:** A 01 H, C 12 N

BEST AVAILABLE COPY

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Februar 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

RECEIVED

# **Gleiss & Große**

Patentanwälte · Rechtsanwälte  
European Patent Attorneys  
European Trademark Attorneys

Intellectual Property Law  
Technology Law

Leitzstraße 45  
D-70469 Stuttgart  
Telefon: +49 (0)711 99 3 11-0  
Telefax: +49 (0)711 99 3 11-200  
E-Mail: [office@gleiss-grosse.com](mailto:office@gleiss-grosse.com)  
Homepage: [www.gleiss-grosse.com](http://www.gleiss-grosse.com)

Dr. jur. Alf-Olav Gleiss · Dipl.-Ing. · PA  
Rainer Große · Dipl.-Ing. · PA  
Dr. Andreas Schrell · Dipl.-Biol. · PA  
Torsten Armin Krüger · RA  
Nils Heide · RA  
Armin Eugen Stockinger · RA  
Georg Brisch · Dipl.-Ing. · PA  
Erik Graf v. Baudissin · RA

PA: Patentanwalt · European Patent Attorney  
European Trademark Attorney

RA: Rechtsanwalt · Attorney-at-law · Admitted for  
Representation at the EU-Trademark Office (OHIM), Alicante

In cooperation with  
Shanghai Zhi Xin Patent Agency Ltd.  
Shanghai · China

## **Patentanmeldung**

---

### **Veränderte PPase-Expression in Zuckerrübe**

---

**SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT**  
Mannheim/Ochsenfurt  
Maximilianstraße 10

**68165 MANNHEIM**

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und  
5 Mittel zur Herstellung einer verbesserten Zuckerrü-  
be, insbesondere einer Zuckerrübe, die einen ge-  
steigerten Saccharosegehalt in ihrem Speicherorgan,  
einen verringerten Saccharoseabbau während der La-  
gerung und ein gesteigertes Wachstum der Rübe auf-  
10 weist. Insbesondere betrifft die Erfindung die Ver-  
wendung mindestens zweier Genkonstrukte zur Gene-  
rierung einer solchen Pflanze sowie dabei einge-  
setzte Nucleotidsequenzen.

Während der Lagerung von Zuckerrüben (*Beta vulga-*  
15 *ris*), das heißt während des Zeitraums zwischen Ern-  
te und weiterer Verarbeitung, insbesondere der Zu-  
ckerextraktion, kommt es zu erheblichen Saccharose-  
verlusten durch Saccharoseabbau in den Speicheror-  
ganen. Dieser Saccharoseabbau findet auch nach Ab-  
schluss des Rübenwachstums zur Aufrechterhaltung  
20 eines „maintenance“-Metabolismus im Rübenkörper  
statt. Während der Lagerung der Rüben wird haupt-  
sächlich die im Rübenkörper akkumulierte Saccharose  
abgebaut. Der Saccharoseabbau ist zum einen von  
25 verschiedenen Umweltfaktoren aber auch vom Ernte-  
prozess selbst abhängig. Er ist auch an eine Quali-  
tätsminderung der Zuckerrüben gekoppelt, da dadurch  
der Anteil reduzierender Zucker wie Fructose oder  
Glucose im Rübenkörper zunimmt (Burba, M., Zeit-

schrift für die Zuckerindustrie 26 (1976), 647-658).

Im Verwundungsbereich zum Beispiel geköpfter geernteter Rüben ist der Saccharoseabbau in erster Linie durch die enzymatische Hydrolyse durch eine wundinduzierte Invertase vermittelt, die primär in den Vakuolen der Rübenzellen lokalisiert ist. Vakuoläre und/oder zellwandgebundene Invertase-Isoformen werden auch bei *de novo*-Verwundungen von Rübegewebe induziert (Rosenkranz, H. et al., *J. Exp. Bot.* 52 (2001), 2381-2385). Diesem Vorgang kann durch Expression eines Invertaseinhibitors (WO 98/04722) oder durch die Expression eines antisense-beziehungsweise eines dsRNA-Konstruktes für die vakuoläre Invertase (WO 02/50109) begegnet werden. Dadurch wird der Saccharoseabbau im Rübenkörper jedoch nur teilweise verhindert. Dies hauptsächlich deshalb, da im restlichen Rübenkörper, also außerhalb des Verwundungsbereichs, überwiegend infolge der dort herrschenden anaeroben Bedingungen der Abbau der Saccharose über revers agierende Saccharosesynthase, UGPase und PFP in einem signifikantem Umfang stattfindet. Für die Enzymaktivität der UGPase (Uridin-diphosphoglucose-Pyrophosphorylase) und der PFP (Pyrophosphat:Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase) in diesem Abbauweg ist cytosolisches anorganisches Pyrophosphat ( $PP_i$ ) erforderlich (Stitt, M., *Bot. Acta* 111 (1998), 167-175).

Es ist bekannt, dass neben ATP-abhängigen Stoffwechselprozessen in der Pflanzenzelle, hauptsächlich

lich unter anaeroben Bedingungen, dissimilierende Enzymreaktionen stattfinden, die von cytosolischem Pyrophosphat als Energielieferant abhängig sind. Demgemäß existieren in der Pflanzenzelle im wesentlichen zwei verschiedene Abbauewege zum Abbau von Saccharose (Stitt, M., a.a.O.):

- 10 1) Hydrolyse der Saccharose in Fructose und Glucose durch Invertase, wobei die durch Hexokinase und Fructokinase in Gegenwart von ATP phosphorylierte Hexose durch die Phosphofructokinase (PFK) ebenfalls unter ATP-Verbrauch in Fructose-1,6-bis-phosphat umgewandelt wird.
- 15 2) Der Abbau von Saccharose durch Saccharose-synthase in UDP-Glucose und in Fructose mit anschließender Konversion der UDP-Glucose zu Hexosephosphat durch UGPase in Gegenwart von Pyrophosphat und Umwandlung des Hexosephosphats in Fructose-1,6-Bisphosphat durch PFP ebenfalls in Gegenwart von Pyrophosphat.
- 20

Der zweite und  $PP_i$ -abhängige Abbaueweg wird unter anaeroben Bedingungen, die bei der Lagerung der Rübenkörper auftreten, in der Pflanzenzelle sogar bevorzugt durchlaufen, da dadurch ATP-Reserven, die bei dem ersten Abbaueweg der Saccharose verbraucht werden würden, erhalten werden. Da bisher bekannte Maßnahmen zur Reduzierung des Saccharoseverlustes hauptsächlich die Hemmung des ersten Abbauewegs (zum Beispiel Invertase-Inhibition) betreffen, welcher

- außer in Verwundungsbereichen - für den Saccharoseverlust bei gelagerten Rüben wenig relevant ist, gibt es zur Zeit keine befriedigende Lösung für das Problem lagerungsbedingter Saccharoseverluste. Andere bekannte Maßnahmen bestehen in der allgemeinen Reduktion enzymatischer Aktivität durch Lagerung bei niederen Temperaturen, beispielsweise unter 12°C, bei gleichzeitig hoher Luftfeuchtigkeit.

Darüber hinaus besteht der Wunsch, Pflanzen, insbesondere Rübenpflanzen, bereitzustellen, die bereits einen gesteigerten Saccharosegehalt in ihren Speicherorganen aufweisen bzw. Rübenpflanzen, die durch verstärktes Wachstum in Folge längerer Meristemaktivität auch einen größeren Rübenkörper bilden und damit mehr Saccharose speichern.

Meristematische Gewebe zeigen einen intensiven Pyrophosphat-Stoffwechsel. Zentrale Syntheseleistungen in den Meristemen wie Zellwandsynthese, Protein-synthese und Nukleinsäuresynthese bilden Pyrophosphat als Reaktionsprodukt, so dass dessen Spaltung die betroffenen enzymatischen Reaktionen fördert. Aus diesem Grund stellt die Kontrolle des Pyrophosphat-Pools in Cytoplasma und Kern durch Pyrophosphat-spaltende bzw. -verbrauchende enzymatische Reaktionen einen wichtigen Mechanismus zur Beeinflussung der meristematischen Aktivität dar. Neben Enzymreaktionen, die Pyrophosphat als Co-Substrat verwenden (PPF, UGPase, s.o.) sind hierbei vakuoläre  $H^+$ -Pyrophosphatasen und lösliche Pyrophosphatasen beteiligt.

Somit liegt die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein System bereitzustellen, das im Wesentlichen Saccharoseverluste in Pflanzen, insbesondere Rübenpflanzen, weiter vermindert, und auch zu  
5 Pflanzen führt, die einen gesteigerten Saccharosegehalt und/oder einen vergrößerten Rübenkörper aufweisen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer  
10 transgenen Pflanze, insbesondere Rübenpflanze, bevorzugt Zuckerrübe (*Beta vulgaris*), mit gesteigertem Saccharosegehalt und bevorzugt vermindertem Saccharoseabbau während der Lagerung gemäß Anspruch 1 gelöst. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß auch ge-  
15 löst durch die Bereitstellung einer durch dieses Verfahren erhältlichen transgenen Pflanze mit einem gesteigerten Saccharosegehalt und insbesondere einem vermindertem Saccharoseabbau während der Lagerung. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß auch gelöst  
20 durch die Bereitstellung mindestens eines Nucleinsäuremoleküls, codierend für ein Protein mit der biologischen Aktivität einer löslichen Pyrophosphatase aus *Beta vulgaris*, insbesondere einer cytosolischen Pyrophosphatase (C-PPase), bevorzugt derselben Pyrophosphatase, die durch Einfügen mindestens einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) in ihrer Kompartimentierung geändert ist, sowie durch die  
25 Bereitstellung mindestens eines Nucleinsäuremoleküls, das einen Promotor einer vakuolären Pyrophosphatase (V-PPase) aus *Beta vulgaris* codiert.  
30

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer transgenen Rübenpflanze mit gesteigertem Saccharosegehalt umfasst

- 5 a) das Transformieren mindestens einer Rübenzelle mit mindestens zwei Transgenen, wobei das erste Transgen für eine vakuoläre Pyrophosphatase (V-PPase) insbesondere aus *Beta vulgaris* und das zweite Transgen für eine cytosolische oder kernlokalisierte lösliche Pyrophosphatase (C-PPase) insbesondere aus *Beta vulgaris* codiert, und daran anschließend
- 10
- 15 b) das Kultivieren und Regenerieren der so transformierten mindestens einen Rübenzelle unter Bedingungen, die zur -teilweisen, bevorzugt vollständigen- Regeneration einer transgenen Rübenpflanze mit gesteigertem Saccharosegehalt führen, wobei anschließend
- 20 c) eine transgene regenerierte Rübenpflanze mit gesteigertem Saccharosegehalt in der Rübe erhalten wird, die einen gesteigerten Saccharosegehalt in der Rübe, bevorzugt einen verminderten Saccharoseabbau während der Lagerung, und/oder bevorzugt einen durch gesteigerte Meristemaktivität vergrößerten Rübenkörper
- 25 aufweist.

Die Erfinder fanden überraschend, dass durch gleichzeitige Expression eines als erstes Transgen bereitgestellten Nucleinsäuremoleküls, das eine V-

PPase insbesondere aus *Beta vulgaris* codiert, vorzugsweise eine V-PPase-cDNA, und eines als zweites Transgen bereitgestellten Nucleinsäuremoleküls, das eine C-PPase insbesondere aus *Beta vulgaris* codiert, vorzugsweise eine C-PPase-cDNA, in der transgenen Zelle einer Rübenpflanze der Saccharoseflux aus der Vakuole gedrosselt, der Transport von Saccharose in die Vakuole hinein gesteigert und der cytosolische Abbau der Saccharose auf dem  $\text{P}_i$ -abhängigen Weg minimiert wird. Die verminderte Verfügbarkeit vakuolärer Saccharose im Cytosol ist dabei primär auf die verstärkte Aktivität des  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Saccharosetransports von Saccharose über die Tonoplastenmembran in die Vakuole zurückzuführen. Der für den Saccharosetransport erforderliche pH-Gradient ist in hohem Maße von der Aktivität der membranständigen V-PPase abhängig. Diese zeigt noch bei geringer Konzentration des Substrats Pyrophosphat hohe Aktivität ( $K_M < 10 \mu\text{mol/l}$ ), während die Affinität löslicher PPasen deutlich niedriger ist ( $K_M > 100 \mu\text{mol/l}$ ). Überraschenderweise kann durch das erfindungsgemäße Verfahren eine transgene Pflanzenzelle, insbesondere eine transgene Pflanze, mit gesteigerter Saccharoseakkumulation erhalten werden.

Durch die erfindungsgemäß vermittelte Expression, insbesondere die Überexpression, transgener cytosolischer bzw. Kern-lokalisierter und/oder transgener vakuolärer Pyrophosphatase wird der Pyrophosphatgehalt in der Pflanzenzelle reduziert. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist dabei die erfindungsge-

mäß vermittelte Expression, insbesondere Überexpression, transgener cytosolischer bzw. Kernlokalisierter zusammen, bevorzugt gleichzeitig, mit der erfindungsgemäß vermittelten Expression, insbesondere Überexpression, transgener vakuolärer Pyrophosphatase. Dadurch wird einerseits der Pyrophosphat-abhängige Saccharoseabbau entscheidend vermindert, andererseits fördert der gesteigerte Pyrophosphatabbau im Cytosol und Zellkern auch verschiedene Syntheseleistungen in den Meristemen der Pflanze, was wiederum wachstumssteigernd wirkt, so dass vergrößerte Rübenkörper erhalten werden. In vorteilhafter Weise wird der Saccharosegehalt in der Vakuole durch die gesteigerte Aktivität der V-PPase erhöht, der Saccharoseabbau im Cytosol signifikant vermindert und die Aktivität der Meristeme, insbesondere lokalisiert an der Peripherie des wachsenden Rübenkörpers, erhöht.

Eine so erhältliche transgene Pflanze weist ein gesteigertes Wachstum sowie insbesondere einen gesteigerten Saccharosegehalt, insbesondere bereits zum Zeitpunkt der Ernte, auf. Der lagerungsbedingte Abbau von Saccharose in der Pflanze ist vermindert und die so erhältliche transgene Pflanze ist lagerungsbeständiger.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „gesteigerten Saccharosegehalt“ ein Gehalt an Saccharose hauptsächlich im Speichergewebe von Pflanzen, insbesondere Rüben, verstanden, der normalerweise um mindestens 5%, insbesondere min-

destens 10%, bevorzugt mindestens 20%, besonders bevorzugt mindestens 30% über dem durchschnittlichen Saccharosegehalt in entsprechenden Geweben vergleichbarer bekannter Rüben liegt. Der durchschnittliche Saccharosegehalt in der Speicherwurzel der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) lag in den letzten 20 Jahren in Deutschland bei  $17,14 \pm 0,56$  Gewichts-% (siehe z.B. Zuckerindustrie 126 (2001) 2: S. 162). Bevorzugt beträgt der durchschnittliche Saccharosegehalt im Speichergewebe der erfindungsgemäß erhältlichen Rüben mehr als 18 Gewichts-%, insbesondere mehr als 21 Gewichts-%.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „gesteigerten“ oder „erhöhten Meristemaktivität“ beziehungsweise einem „verbesserten Meristemwachstum“ eine Steigerung des Wachstums der Rübe (bezogen auf das Frischgewicht) normalerweise um mindestens 5%, bevorzugt mindestens 10%, besonders bevorzugt mindestens 19% gegenüber dem durchschnittlichen Wachstum vergleichbarer bekannter Rüben verstanden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Transgen“ ein Gen verstanden, das in Form von DNA oder RNA, vorzugsweise cDNA, in eine Eukaryontenzelle transfiziert, das heißt transformiert, werden kann, wodurch insbesondere fremde genetische Information in die transfizierte Eukaryontenzelle eingebracht wird. Dabei wird unter einem „Gen“ mindestens eine unter der operativen Kontrolle mindestens eines regulatorischen Elementes ste-

- hende insbesondere Protein-codierende Nucleotidsequenz, das heißt ein oder mehrere informationstragende Abschnitte von DNA-Molekülen, verstanden. Transgene liegen nach erfolgter Transfektion der
- 5 Eukaryontenzelle als Nucleinsäuremolekül(e) transient oder aber in das Genom der transfizierten Zelle integriert vor, wobei diese natürlicherweise in dieser Zelle nicht vorkommen, oder sie liegen an einem Ort im Genom dieser Zelle integriert vor, an
- 10 dem sie natürlicherweise nicht vorkommen, das heißt Transgene sind in einer anderen genomischen Umgebung lokalisiert oder liegen in einer anderen als der natürlichen Kopienzahl vor oder stehen unter Kontrolle eines anderen Promotors.
- 15 Erfindungsgemäß bevorzugt umfasst das erste Transgen, welches für eine V-PPase insbesondere aus *Beta vulgaris* codiert, mindestens ein Nucleinsäuremolekül, wobei die Sequenz dieses Nucleinsäuremoleküls ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
- 20 a) einer Nucleotidsequenz dargestellt in Sequenz ID Nr. 4, der komplementären Sequenz davon,
- b) einer Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuresequenz dargestellt in Sequenz ID Nr. 5 codiert sowie deren komplementäre Nucleotidsequenz und
- 25 c) einer modifizierten Nucleotidsequenz, wobei ein modifiziertes Nucleinsäuremolekül der modifizierten Nucleotidsequenz mit dem Nuclein-

säuremolekül mit der Nucleotidsequenz nach a) oder b) hybridisiert und dabei eine Sequenzidentität von mehr als 80%, bevorzugt mehr als 90%, 95% oder 99%, aufweist.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt umfasst das zweite Transgen, welches für eine C-PPase insbesondere aus *Beta vulgaris* codiert, mindestens ein Nucleinsäuremolekül, wobei die Sequenz dieses Nucleinsäuremoleküls ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

10 a) einer Nucleotidsequenz dargestellt in Sequenz ID Nr. 1, der komplementären Sequenz davon,

b) einer Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuresequenz, dargestellt in Sequenz ID Nr. 2 codiert, sowie deren komplementäre Nucleotidsequenz und

15

c) einer modifizierten Nucleotidsequenz, wobei ein modifiziertes Nucleinsäuremolekül der modifizierten Nucleotidsequenz mit dem Nucleinsäuremolekül mit der Nucleotidsequenz nach a) oder b) hybridisiert und dabei eine Sequenzidentität von mehr als 80%, bevorzugt mehr als 90%, 95% oder 99%, aufweist.

20

In einer bevorzugten Variante umfasst die Nucleotidsequenz des vorgenannten erfindungsgemäß bevorzugten C-PPase-Nucleinsäuremoleküls außerdem mindestens eine Kernlokalisierungssequenz.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das mindestens eine erste Transgen auf einem Vektor angeordnet. Erfindungsgemäß bevorzugt kann auch das mindestens eine  
 5 zweite Transgen auf einem Vektor angeordnet sein. Besonders bevorzugt sind sowohl erstes als auch zweites Transgen auf einem Vektor, insbesondere dem gleichen Vektor angeordnet. Der Vektor liegt in bevorzugter Ausführung in isolierter und gereinigter  
 10 Form vor.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind das mindestens eine erste Transgen, codierend für eine V-PPase, und das mindestens eine zweite Transgen, codierend für eine  
 15 C-PPase, auf einem einzigen Vektor zusammen angeordnet, wobei insbesondere das erste Transgen in 5'- zu 3'-Richtung vor dem zweiten Transgen angeordnet ist. In einer alternativen Variante ist das zweite Transgen in 5'- zu 3'-Richtung vor dem ersten  
 20 Transgen auf dem Vektor angeordnet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist mindestens ein erstes Transgen auf mindestens einem ersten Vektor und mindestens ein zweites Transgen auf mindestens einem vom dem ersten Vektor verschiedenen  
 25 zweiten Vektor angeordnet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden erstes und zweites Transgen gleichzeitig in mindestens eine Pflanzenzelle, insbesondere Rübenzelle transfiziert, das heißt transformiert. Bevorzugt wird die Transformation durch ballistische In-  
 30

jektion, das heißt durch biolistische Transformati-  
on, in an sich bekannter Weise durchgeführt. In ei-  
ner weiteren Variante findet die Transformation  
durch Elektrotransformation, bevorzugt mittels E-  
lektroporation, in an sich bekannter Weise statt.  
5 In einer weiteren Variante wird die Transformation  
durch Agrobakterien, bevorzugt mittels insbesondere  
*Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizo-*  
*genes*, als Transformationsmittel in an sich bekann-  
ter Weise durchgeführt. In einer weiteren Variante  
10 wird die Transformation mittels Viren in an sich  
bekannter Weise durchgeführt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wer-  
den unter „Vektoren“ insbesondere Liposomen, Cosmi-  
15 de, Viren, Bacteriophagen, Shuttle-Vektoren und an-  
dere in der Gentechnik übliche Vektoren verstanden.  
Bevorzugt werden darunter Plasmide verstanden. In  
einer besonders bevorzugten Variante ist dies der  
pBinAR-Vektor (Höfgen und Willmitzer, 1990). Diese  
20 Vektoren besitzen bevorzugt noch mindestens eine  
weitere Funktionseinheit, die insbesondere eine  
Stabilisierung und/oder Replikation des Vektors im  
Wirtsorganismus bewirkt oder dazu beiträgt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des  
25 erfindungsgemäßen Verfahrens werden Vektoren einge-  
setzt, bei denen mindestens ein erfindungsgemäßes  
Nucleinsäuremolekül unter der funktionellen Kon-  
trolle von mindestens einem regulatorischen Element  
steht. Erfindungsgemäß werden unter dem Begriff  
30 "regulatorisches Element" solche Elemente verstan-

den, welche die Transkription und/oder Translation von Nucleinsäuremolekülen in prokaryontischen und/oder eukaryontischen Wirtszellen gewährleisten, so dass ein Polypeptid oder Protein exprimiert wird. Bei regulatorischen Elementen kann es sich um Promotoren, Enhancer, Silencer und/oder Transkriptionsterminationssignale handeln. Regulatorische Elemente, die mit einer erfindungsgemäßen Nucleotidsequenz, insbesondere den Protein-codierenden Abschnitten dieser Nucleotidsequenz, funktionell verbunden sind, können Nucleotidsequenzen sein, die aus anderen Organismen oder anderen Genen stammen als die Protein-codierende Nucleotidsequenz selbst. In einer bevorzugten Variante besitzt der erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Vektor mindestens ein weiteres Regulationselement, insbesondere mindestens einen Intrans-Enhancer.

Bevorzugt sind die eingesetzten Vektoren zur Überexpression des ersten oder zweiten Transgens oder beider Transgene ausgestattet. Dies wird insbesondere dadurch erreicht, dass das mindestens eine erste und/oder das mindestens eine zweite Transgen auf dem Vektor operativ verknüpft zu mindestens einem Promotor vorliegen. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist der Promotor ein gewebespezifischer Promotor, ein konstitutiv exprimierender (=konstitutiver) Promotor oder ein induzierbarer Promotor. Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Promotor auch ein lagerungsspezifischer Promotor. In einer besonders bevorzugten Variante besitzt der Pro-

motor auf dem vorgenannten Vektor eine Kombination der Eigenschaften der vorgenannten Promotoren.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der mindestens eine Promotor ein Promotor aus einer Rübenpflanze, insbesondere aus *Beta vulgaris*. Bevorzugt ist dies ein Promotor der vakuolären Pyrophosphatase (V-PPase-Promotor). In weiteren besonders bevorzugten Ausführungsformen ist der mindestens eine Promotor ein Promotor aus *Arabidopsis*  
10 *thaliana* oder ein Promotor aus dem Blumenkohlmosaik-Virus (CaMV), insbesondere der CaMV35S-Promotor. In einer weiteren bevorzugten Variante ist der mindestens eine Promotor ein Saccharosesynthase-Promotor.

15 Die erfindungsgemäß bevorzugte Überexpression der vakuolären Pyrophosphatase, bevorzugt unter der Kontrolle mindestens eines CaMV35S-Promotors, führt zu einer deutlich verbesserten Energetisierung der Vakuole, das heißt zu einem erhöhten pH-Gradienten,  
20 was hauptsächlich zur verstärkten Akkumulation von Speicherstoffen, insbesondere von Saccharose in der Vakuole führt; hauptsächlich deshalb, da durch die durch die erfindungsgemäß bevorzugte Überexpression bedingte Ansäuerung der Vakuole der aktive Saccharosetransport in das Lumen der Vakuole gesteigert  
25 wird.

Darüber hinaus wird durch die erfindungsgemäß bevorzugte Überexpression der C-PPase insbesondere erreicht, dass der Abbau an cytosolischem bezie-

hungsweise nukleärem Pyrophosphat ( $PP_i$ ) im Vergleich zu einer nicht transformierten Rübenzelle erheblich gesteigert wird. Ein auf diese Weise wesentlich verminderter Anteil an cytosolischem beziehungsweise nukleärem Pyrophosphat führt zu einem verminderten  $PP_i$ -abhängigen Saccharoseabbau beziehungsweise durch Aktivierung verschiedener Syntheseleistungen (s.o.) zu einer gesteigerten Meristemaktivität. Zusammen mit der durch die Überexpression der V-PPase gesteigerten Akkumulation von Speicherstoffen, insbesondere von Saccharose in der Vakuole kommt es bevorzugt bereits vor der Ernte, das heißt beim Heranwachsen der Pflanze, in der erfindungsgemäß erhältlichen transgenen Rübe zu einem gesteigerten Saccharosegehalt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nucleinsäuremolekül, das ein Protein mit der biologischen Aktivität einer löslichen Pyrophosphatase insbesondere aus *Beta vulgaris*, insbesondere einer cytosolischen Pyrophosphatase (C-PPase) - bevorzugt nach dem an sich bekannten universellen genetischen Standardcode - codiert, wobei die Sequenz dieses Nucleinsäuremoleküls ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) einer Nucleotidsequenz dargestellt in Sequenz ID Nr. 1, der komplementären Sequenz davon,
- b) einer Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuresequenz, welche in Sequenz ID Nr. 2 darge-

stellt ist, codiert sowie deren komplementäre Nucleotidsequenz und

- 5 c) einer modifizierten Nucleotidsequenz, wobei ein modifiziertes Nucleinsäuremolekül der modifizierten Nucleotidsequenz mit dem Nucleinsäuremolekül mit der Nucleotidsequenz nach a) oder b) hybridisiert und dabei eine Sequenzidentität von mehr als 80%, bevorzugt mehr als 90%, 95% oder 99%, aufweist.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nucleinsäuremolekül, das ein Protein mit der biologischen Aktivität einer vakuolären Pyrophosphatase insbesondere aus *Beta vulgaris* - bevorzugt nach dem an sich bekannten universellen  
15 genetischen Standardcode - codiert, wobei die Sequenz dieses Nucleinsäuremoleküls ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) einer Nucleotidsequenz dargestellt Sequenz ID Nr. 4, der komplementären Sequenz davon,
- 20 b) einer Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuresequenz, welche in Sequenz ID Nr. 5 dargestellt ist, codiert sowie deren komplementäre Nucleotidsequenz und
- 25 c) einer modifizierten Nucleotidsequenz, wobei ein modifiziertes Nucleinsäuremolekül der modifizierten Nucleotidsequenz mit dem Nucleinsäuremolekül mit der Nucleotidsequenz nach a)

oder b) hybridisiert und dabei eine Sequenz-identität von mehr als 80%, bevorzugt mehr als 90%, 95% oder 99%, aufweist.

5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nucleinsäuremolekül, das für einen Promotor der vakuolären Pyrophosphatase (V-PPase) insbesondere aus *Beta vulgaris* - bevorzugt nach dem an sich bekannten universellen genetischen Standardcode - codiert, wobei die Sequenz des Nucleinsäuremoleküls  
10 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) einer Nucleotidsequenz dargestellt in Sequenz ID Nr. 6, der komplementären Sequenz davon,
- b) einer Nucleotidsequenz dargestellt in Sequenz ID Nr. 7, der komplementären Sequenz davon  
15 und
- c) einer modifizierten Nucleotidsequenz, wobei ein modifiziertes Nucleinsäuremolekül der modifizierten Nucleotidsequenz mit dem Nucleinsäuremolekül nach a) oder b) hybridisiert und dabei eine Sequenzidentität von mehr als 80%,  
20 90%, 95% oder 99% aufweist.

Das Nucleinsäuremolekül ist dabei bevorzugt ein DNA-Molekül, zum Beispiel cDNA oder genomische DNA, oder ein RNA-Molekül, zum Beispiel mRNA. Das Nucleinsäuremolekül stammt bevorzugt aus der Zuckerrübe  
25 *Beta vulgaris*. Vorzugsweise liegt das Nuclein-

säuremolekül in isolierter und gereinigter Form vor.

Die Erfindung umfasst somit auch modifizierte Nucleinsäuremoleküle mit einer modifizierten Nucleotidsequenz, die beispielsweise durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder einiger Basen eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls, insbesondere innerhalb der codierenden Sequenz einer Nucleinsäure, erhältlich sind, das heißt Nucleinsäuremoleküle, die als Mutanten, Derivate oder funktionelle Äquivalente eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls bezeichnet werden können. Solche Manipulationen der Sequenzen werden beispielsweise durchgeführt, um die von einer Nucleinsäure codierte Aminosäuresequenz gezielt zu verändern. Zum Beispiel codieren die erfindungsgemäß bevorzugten modifizierten Nucleinsäuren veränderte Enzyme, insbesondere veränderte vakuoläre und/oder cytosolische Pyrophosphatasen und/oder insbesondere mit veränderter enzymatischer Aktivität und werden insbesondere zur Transformation landwirtschaftlich genutzter Pflanzen verwendet, hauptsächlich um transgene Pflanzen herzustellen. Solche Modifikationen dienen erfindungsgemäß bevorzugt auch dem Ziel, innerhalb der Nucleinsäuresequenz geeignete Restriktionsschnittstellen bereitzustellen oder nicht erforderliche Nucleinsäuresequenzen oder Restriktionsschnittstellen zu entfernen. Dabei werden die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Plasmiden insertiert und mittels Standardverfahren der Mikrobiologie beziehungsweise

Molekularbiologie in an sich bekannter Weise einer Mutagenese oder einer Sequenzveränderung durch Rekombination unterzogen.

5 Zur Erzeugung von Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie Transitionen und Transversionen, sind beispielsweise Verfahren zur in vitro-Mutagenese, "primer repair"-Verfahren sowie Restriktions- und/oder Ligationsverfahren geeignet (vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA). Sequenzveränderungen lassen sich auch durch Anlagerung natürlicher oder synthetischer Nucleinsäuresequenzen erreichen. Beispiele für synthetische Nucleinsäuresequenzen sind 10 Adaptoren oder Linker, die u.a. auch zur Verknüpfung von Nucleinsäure-Fragmenten an diese Fragmente angefügt werden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch natürlich vorkommende Sequenzvarianten der erfindungsgemäßen oder erfindungsgemäß eingesetzten 15 Nucleinsäuremoleküle. 20

Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendeten Formulierungen analog zu der Formulierung "modifiziertes Nucleinsäuremolekül, das mit einem Nucleinsäuremolekül hybridisiert" bedeuten, 25 dass ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise unter mäßig stringenten Bedingungen mit einem anderen, davon verschiedenen Nucleinsäuremolekül hybridisiert. Beispielsweise kann die Hybridisierung mit einer radioaktiven Gensonde in einer 30 Hybridisierungslösung (zum Beispiel: 25% Formamid,

5 x SSPE, 0,1% SDS, 5 x Denhardt-Lösung, 50 mg/ml Heringsperma-DNA, bezüglich Zusammensetzung der Einzelkomponenten) 20 Stunden bei 37°C erfolgen (vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA). Anschließend wird die unspezifisch gebundene Sonde beispielsweise durch mehrfaches Waschen der Filter in 2 x SSC/0,1% SDS bei 42°C entfernt. Vorzugsweise wird 0,5 x SSC/0,1% SDS, besonders bevorzugt mit 0,1 x SSC/0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Diese erfindungsgemäß bevorzugten hybridisierenden Nucleinsäuremoleküle weisen in bevorzugter Ausführungsform mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 85%, 90%, 95%, 98% und besonders bevorzugt mindestens 99% Homologie, das heißt Sequenzidentität auf Nucleinsäureebene zueinander auf.

Der Ausdruck "Homologie" bezeichnet in diesem Zusammenhang den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehreren Nucleinsäuremolekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen ihren Nucleotidsequenzen bestimmt wird. Der Prozentsatz der "Homologie" ergibt sich aus dem Prozentsatz übereinstimmender Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten. Bevorzugt werden dafür die zu vergleichenden Nucleotidsequenzen der Nucleinsäuremoleküle über ihre gesamte Sequenzlänge verglichen.

Bevorzugte und an sich bekannte Verfahren zur Bestimmung der Homologie, die hauptsächlich in Compu-

terprogrammen verwirklicht sind, erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den zu vergleichenden Sequenzen, zum Beispiel das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12 (12) (1984); 387; Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S., et al., J. Molec Bio 215 (1990), 403-410). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung der Homologie verwendet werden. Die Auswahl der Programme hängt sowohl von dem durchzuführenden Vergleich als auch davon ab, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren durchgeführt wird, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt eingesetzter Vektor, welcher mindestens eine der Sequenzen der vorgenannten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthält. Erfindungsgemäß bevorzugt ist dieser Vektor ein viraler Vektor. In einer weiteren Variante ist dieser Vektor bevorzugt ein Plasmid, in einer besonders bevorzugten Variante der pBinAR-Vektor. In einer Variante werden bevorzugt auch die Vektoren erfasst, bei denen das in ihnen enthaltene mindestens eine erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül mit mindestens einem regulatorischen Element operativ verbunden ist, das die Transkription und Synthese translatierbarer Nucleinsäuremoleküle in

Pro- und/oder Eukaryontenzellen gewährleistet. Derartige regulatorische Elemente sind bevorzugt Promotoren, Enhancer, Operatoren und/oder Transkriptionsterminationssignale. Die vorgenannten erfindungsgemäßen Vektoren enthalten bevorzugt zusätzlich Antibiotikum-Resistenzgene, Herbizid-Resistenzgene und/oder andere übliche Selektionsmarker.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit mindestens einem der vorgenannten erfindungsgemäßen Vektoren transformiert ist, wobei diese Wirtszelle bevorzugt eine bakterielle Zelle, eine pflanzliche Zelle oder eine tierische Zelle ist. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch eine transgene und vorzugsweise fertile Pflanze, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten wird, wobei mindestens eine der Zellen dieser Pflanze transformiert ist und diese Pflanze bevorzugt durch einen gesteigerten Saccharosegehalt und/oder ein gesteigertes Wachstum in Folge vermehrter Meristemaktivität gekennzeichnet sind. Selbstverständlich umfasst die Erfindung auch die aus den erfindungsgemäßen transformierten Pflanzen erhaltenen Nachkommen und Weiterzuchtungen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen oder erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäuremolekül(en) transformiert, das heißt transfiziert wurden, sowie transgene Pflanzenzel-

len, die von derartigen transformierten Zellen abstammen. Derartige Zellen enthalten ein oder mehrere erfindungsgemäß eingesetzte oder erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül(e), wobei diese(s) vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist/sind, welche die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen insbesondere dadurch unterscheiden, dass sie mindestens ein erfindungsgemäßes oder erfindungsgemäß eingesetztes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt, und/oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt, das heißt in einer anderen genomischen Umgebung oder in einer anderen als der natürlichen Kopienzahl vorliegt und/oder unter der Kontrolle mindestens eines anderen Promotors steht.

Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die Erfindung betrifft auch Pflanzen, die mindestens eine, bevorzugt jedoch eine Vielzahl von Zellen enthalten, welche die erfindungsgemäßen oder die erfindungsgemäß eingesetzten Vektorsysteme, aber auch Derivate oder Teile davon enthalten, und welche aufgrund der Aufnahme dieser Vektorsysteme, Derivate oder Teile davon zu einer Synthese

von Polypeptiden (Proteinen) befähigt sind, die eine modifizierte Pyrophosphataseaktivität bewirken. Die Erfindung ermöglicht also die Bereitstellung von Pflanzen der verschiedensten Arten, Gattungen, Familien, Ordnungen und Klassen, welche insbesondere die vorgenannten Charakteristika aufweisen. Bei den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen handelt es sich prinzipiell um monocotyle oder dicotyle Pflanzen wie Graminae, Pinidae, Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Rosidae, Asteridae, Aridae, Liliidae, Arecidae, Commelinidae sowie Gymnospermae aber auch um Algen, Moose, Farne oder auch Calli, Pflanzenzellenkulturen etc., sowie um Teile, Organe, Gewebe, Ernte- oder Vermehrungsmaterialien davon. Bevorzugt handelt es sich aber um Nutzpflanzen, insbesondere um Saccharose synthetisierende und/oder speichernde Pflanzen wie die Zuckerrübe.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist Erntematerial und Vermehrungsmaterial der vorgenannten erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen, beispielsweise Blüten, Früchte, Samen, Knollen, Wurzeln, Blätter, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, etc.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung von mindestens einem der vorgenannten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle zur Herstellung einer solchen vorgenannten transgenen Pflanze mit mindestens einer transformierten Zelle, insbe-

sondere in Verbindung mit mindestens einem der vor-  
genannten Vektoren.

Das Sequenzprotokoll ist Teil dieser Beschreibung  
und erläutert die vorliegende Erfindung; es enthält  
5 die Sequenzen mit SEQ ID Nr. 1 bis 7:

- 10 SEQ ID Nr. 1 zeigt die 1041 Nucleotide umfassende  
DNA-Sequenz des die lösliche Beta-  
Pyrophosphatase codierenden Nuclein-  
säuremoleküls aus *Beta vulgaris*  
(bsp1);
- SEQ ID Nr. 2 zeigt die 222 Aminosäuren umfassende  
Polypeptidsequenz der löslichen Be-  
ta-Pyrophosphatase aus *Beta vulgaris*  
(BSP1);
- 15 SEQ ID Nr. 3 zeigt die 245 Aminosäuren umfassende  
Polypeptidsequenz einer rekombinan-  
ten löslichen Beta-Pyrophosphatase  
in Vektor pQE30 mit N-terminalem  
His-Tag;
- 20 SEQ ID Nr. 4 zeigt die 2810 Nucleotide umfassende  
DNA-Sequenz des die vakuoläre Beta-  
Pyrophosphatase codierenden Nuclein-  
säuremoleküls aus *Beta vulgaris* der  
Isoform I (bvpl);
- 25 SEQ ID Nr. 5 zeigt die 764 Aminosäuren umfassende  
Polypeptidsequenz der vakuolären Be-  
ta-Pyrophosphatase aus *Beta vulgaris*  
der Isoform I (BVP1);

- SEQ ID Nr. 6 zeigt die 1733 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des bvp1-Promotors für die vakuoläre Beta-Pyrophosphatase aus *Beta vulgaris* der Isoform I;
- 5 SEQ ID Nr. 7 zeigt die 962 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des bvp2-Promotors für die vakuoläre Beta-Pyrophosphatase aus *Beta vulgaris* der Isoform II.
- 10 SEQ ID Nr. 8 zeigt die 18 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Sense-Primers gemäß Beispiel 1.
- SEQ ID Nr. 9 zeigt die 22 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Antisense-Primers gemäß Beispiel 1.
- 15 SEQ ID Nr. 10 zeigt die 38 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Sense-Primers gemäß Beispiel 2.
- 20 SEQ ID Nr. 11 zeigt die 38 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Antisense-Primers gemäß Beispiel 2.
- SEQ ID Nr. 12 zeigt die 31 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Sense-Primers gemäß Beispiel 4.
- 25 SEQ ID Nr. 13 zeigt die 31 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Antisense-Primers gemäß Beispiel 4.
- SEQ ID Nr. 14 zeigt die 30 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Sense-Primers gemäß Beispiel 5.

- SEQ ID Nr. 15 zeigt die 31 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Antisense-Primers gemäß Beispiel 5.
- 5 SEQ ID Nr. 16 zeigt die 34 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Sense-Primers gemäß Beispiel 6.
- SEQ ID Nr. 17 zeigt die 35 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Antisense-Primers gemäß Beispiel 6.
- 10 SEQ ID Nr. 18 zeigt die 20 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz eines Sense-Primers gemäß Beispiel 7.
- 15 SEQ ID Nr. 19 zeigt die 21 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz eines Antisense-Primers gemäß Beispiel 7.
- SEQ ID Nr. 20 zeigt die 24 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz eines Sense-Primers gemäß Beispiel 7.
- 20 SEQ ID Nr. 21 zeigt die 20 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz eines Antisense-Primers gemäß Beispiel 7.

Die vorliegende Erfindung wird durch die Figuren 1 bis 10 und die folgenden Beispiele näher erläutert.

- 25 Figur 1 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transformierter Rübenzellen: Figur 1a zeigt eine transformierte *Beta vulgaris*-Zelle im Durchlicht, Figur 1b zeigt die subzelluläre Lokalisation des RFP-

Kontrollplasmids in den Plastiden und Figur 1c zeigt die subzelluläre Lokalisation mit GFP fusionierter löslicher Pyrophosphatase (BSP1) in den cytoplasmatischen und kernnahen Bereichen des Protoplasten;

Figur 2 zeigt biochemische Eigenschaften der löslichen Beta-Pyrophosphatase (BSP1): Figur 2a zeigt die pH-Abhängigkeit und Figur 2b die Temperatur-Abhängigkeit der Enzymaktivität, Figur 2c zeigt die Ermittlung des  $K_m$ -Werts für Pyrophosphat (Eadie-Hofstee-Diagramm);

Figur 3 zeigt die Protonen-Pumpaktivität in drei Monate gelagerten Rüben: Figur 3a zeigt die V-PPase-Aktivität, Figur 3b zeigt die V-ATPase-Aktivität;

Figur 4 zeigt eine Westernblot-Analyse für BSP1 in Blatt und Rübe;

Figur 5 zeigt eine Westernblot-Analyse der V-PPase in der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*);

Figur 6 zeigt die Northernblot-Analyse von V-PPase und V-ATPase in Keimlingen der Zuckerrübe;

Figur 7 zeigt die Northernblot-Analyse der V-PPase bei Stressbehandlung von Suspensionskulturzellen der Zuckerrübe;

Figur 8 zeigt die Northernblot-Analyse der Expressionsmuster nach Verwundung von Zuckerrüben;

Figur 9 zeigt die Northernblot-Analyse der entwicklungsabhängigen Expression des Polypeptids der V-PPase aus *Beta vulgaris* der Isoform II (BVP2);

Figur 10 zeigt den schematischen Aufbau von rekombinanten Vektoren: Figur 10a zeigt den gemäß Beispiel 4 erhaltenen Vektor, Figur 10b den gemäß Beispiel 5 erhaltenen Vektor, Figur 10c den gemäß Beispiel 6 erhaltenen Vektor.

Beispiel 1: Isolierung der cDNA-Sequenz einer löslichen Pyrophosphatase aus *Beta vulgaris* L. (BSP1)

Aus Suspensionskulturzellen von *Beta vulgaris* L. wurde die Gesamt-RNA nach Logemann et al. (Analyt. Biochem., 163 (1987), 16-20) isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Aufgrund von Sequenzvergleichen wurden degenerierte Primer hergestellt mit deren Hilfe durch PCR eine 435 bp lange partielle cDNA-Sequenz aus dem codierenden Bereich der löslichen Pyrophosphatase aus Zuckerrübe (bsp1) amplifiziert wurde:

Sense-Primer:

TGC TGC TCA TCC WTG GCA

(SEQ ID Nr. 8)

Antisense-Primer:

TCR TTY TTC TTG TAR TCY TCA A (SEQ ID Nr. 9)

Durch RLM-RACE-Technologie (GeneRacer™ Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) wurde anschließend die Sequenz der bsp1-Vollängen-cDNA (1041 bp) (SEQ ID Nr. 1) bestimmt, die demnach aus einem 666 bp langen ORF besteht, welcher von einer 118 bp langen 5'-UTR und einer 257 bp langen 3'-UTR flankiert wird. Die von dem ORF der bsp1-cDNA codierte Aminosäuresequenz ist in SEQ ID Nr. 2 dargestellt und weist 222 Aminosäuren auf.

Die Tabellen 1 und 2 zeigen biochemische Eigenschaften von BSP1 und den Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Aktivität des BSP1:

15 Tabelle 1:

Biochemische Eigenschaften von BSP1	
Aminosäuren	222
Größe	25,5 kDa
pI (errechnet)	5,62
Oligomerisierungsgrad *	evtl. Tetramer (Gelfiltration)
pH-Optimum *	pH 8,5
Temperatur-Optimum *	53° C
K <sub>m</sub> PP <sub>i</sub> (2,5 m mol/l Mg) *	~160 µmol/l
Zweiwertige Kationen *	Mg <sup>2+</sup> essentiell, Ca <sup>2+</sup> (kompetitiv) hemmend

\*)ermittelt anhand des rekombinanten Proteins, pQE30-Vektor (Qiagen®, Hilden, Deutschland) mit N-terminalem HIS-Tag; die Aminosäuresequenz ist in SEQ ID Nr. 3 dargestellt. Für die Amplifikation des codierenden Bereichs von bsp1 wurden dieselben Primer verwendet, die unter Beispiel 2 beschrieben sind (SEQ ID Nr. 10 und 11).

Tabelle 2:

Einfluss zweiwertiger Ionen auf die BSP1-Aktivität		
Magnesium-Konz. [mmol/l]	Calcium-Konz. [mmol/l]	Relative Pyrophosphatase-Aktivität [%]
2,5	0	100
2,5	0,05	55
2,5	0,5	6
0	0	0

10 Ergebnisse:

Figur 2a zeigt die Ergebnisse der pH-Wert-Bestimmung (pH 8,5), Figur 2b die Ergebnisse der Temperaturoptimum-Bestimmung (53°C) und Figur 2c die Ergebnisse der  $K_M$ -Wert-Bestimmung (160  $\mu\text{mol/l}$  PPI).

Beispiel 2: Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von BSP1

Neben der computergestützten Analyse der BSP1-Primärsequenz im Hinblick auf Signalpeptide wurde  
 5 der codierende Bereich in einen modifizierten pFF<sub>19</sub>G-Vektor (Timmermanns et al., J. Biotech. 14 (1990), 333-344) kloniert, der anstelle des  $\beta$ -Glucoronidase-Strukturgens die Sequenz des "green fluorescent protein" (GFP) trägt (Sheen, et al.,  
 10 Plant J. 8(5) (1995), 777-784). Der dafür verwendete Sense-Primer enthält neben einer BamHI-Schnittstelle (unterstrichen) unmittelbar vor dem Start-ATG eine „Kozak“-Sequenz, um eine optimale Translation zu gewährleisten. Der Antisense-Primer  
 15 enthält sowohl eine PstI- als auch eine SalI-Schnittstelle (unterstrichen):

Sense-Primer:

GTC GGG ATC CGC CAC CAT GGA TGA GGA GAT GAA TGC TG  
 (SEQ ID Nr. 10)

20 Antisense-Primer:

GAA GCT GCA GGT CGA CTC TCC TCA ATG TCT GTA GGA TG  
 (SEQ ID Nr. 11).

Nachdem sowohl das bsp1-Amplifikat als auch der pFF<sub>19</sub>G-Vektor mit BamHI und PstI geschnitten worden  
 25 waren, erfolgte die Ligation und anschließend die biolistische Transformation von *Beta vulgaris*-Suspensionskulturzellen mit Hilfe einer Partikelkanone (Biolistic® PDS-1000/He, BioRad, Hercules,

Kalifornien, USA). Dabei wurde gleichzeitig ein pFF<sub>19</sub>G-Kontrollplasmid eingebracht, das die Sequenz für ein Fusionsprotein aus einem 81 Aminosäuren langen Peptid der plastidären  $\gamma$ -ECS aus *Brassica juncea* und dem "red fluorescent protein" aus *Disco-*  
5 *soma spec.* (dsRED) enthielt (Jach et al., Plant J. 28(4) (2001), 483-491). 24 h nach dem Beschuss wurden die Zellwände mittels lytischer Enzyme verdaut, und nach weiteren 24 h wurde die transiente Expression der beiden Fusionsproteine in den Protoplasten  
10 fluoreszenzmikroskopisch an einem Inverslichtmikroskop untersucht. Die Analyse des GFP-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe eines FITC-Filters (Anregung: 450-490 nm, Emission: 515 nm  
15 Langpass), im Fall des dsRED-Fusionsproteins wurde ein XF137-2-Filter (Anregung: 540 $\pm$ 30 nm, Emission: 585 nm Langpass) verwendet.

#### Ergebnisse:

Figur 1 zeigt die subzelluläre Lokalisation von BSP1 ermittelt durch fluoreszenzmikroskopische GFP-Analyse transformierter Rübenzellen: Aus Figur 1a  
20 wird ersichtlich, dass eine transformierte *Beta vulgaris*-Zelle nicht von einer untransformierten zu unterscheiden ist. Figur 1b betrifft das RFP-Kontrollplasmid. Zu erkennen ist, dass die Plastiden rot (hell) aufleuchten aufgrund des plastidären Signalpeptids der plastidären  $\gamma$ -ECS. In Figur  
25 1c zeigt die Anregung des GFP, dass die mit dem GFP fusionierte lösliche Pyrophosphatase kein plastidäres Signalpeptid aufweist. Deutlich ist die cy-  
30

toplasmatische und Kernlokalisation im Protoplasten zu erkennen. BSP1 ist offensichtlich eine cytosolische beziehungsweise kernlokalisierte lösliche Pyrophosphatase. Diese wird auch als C-PPase bezeichnet.

### Beispiel 3: Funktionsnachweis durch Überexpression von BSP1 in *E. coli*

Die codierende Sequenz für die C-PPase aus *Beta vulgaris* (BSP1) wurde mittels PCR amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer waren dieselben wie bei der oben beschriebenen Amplifikation für das pFF<sub>19</sub>::GFP-Konstrukt (Beispiel 2).

Die Klonierung in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen®, Hilden) erfolgte über *Bam*HI/*Sal*I. Das Konstrukt wurde zusammen mit einem pUBS520-Plasmid (Brinkmann et al., Gene 85(1) (1989), 109-114) in *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert.

Die Produktion von BSP1 wurde mittels 1 mmol/l IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid) induziert, nachdem die Bakterien eine Dichte von OD<sub>600</sub>=1 erreicht hatten. Das Wachstum erfolgte über Nacht bei 37° C. Die Aufreinigung von BSP1 wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels einer French-Presse. Der dabei verwendete Lysispuffer enthielt 50 mmol/l MOPS (pH 8), 300 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Imidazol und 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>. Nach der durch die 6 N-terminalen

Histidine vermittelten Bindung an eine Nickel-NTA-Matrix erfolgten mehrere Waschschrirte mit steigender Imidazol-Konzentration (20-75 mmol/l) unter sonst gleichen Pufferbedingungen. Die Elution erfolgte analog mittels 100-250 mmol/l Imidazol.

Für den Aktivitätsassay wurde 50 µl Proteinlösung mit 200 µl Reaktionspuffer (Standard: 50 mmol/l Tris (pH 8,5), 1 mmol/l Pyrophosphat, 2,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>) versetzt und 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 750 µl Färbelösung (3,4 mmol/l Ammoniummolybdat in 0,5 mol/l Schwefelsäure, 0,5 mol/l SDS, 0,6 mol/l Ascorbinsäure: 6:2:1, v/v/v) gestoppt. Nach 20 min wurde die Absorption bei 820 nm gemessen (Rojas-Beltrán et al. 39 (1999), 449-461).

#### 15 Beispiel 4: Klonierung der löslichen Pyrophosphatase BSP1 (C-PPase) in den Transformationsvektor pBinAR

Anhand der im folgenden genannten Primer und der oben beschriebenen cDNA aus Suspensionskulturzellen wurde die 1041 bp lange Vollängen-cDNA (SEQ ID Nr. 1) der löslichen Pyrophosphatase (BSP1) mittels PCR amplifiziert. Die Enden der Primer waren mit KpnI- (Sense-Primer) bzw. XbaI- (Antisense-Primer) Schnittstellen (unterstrichen) versehen, um das Amplifikat anschließend in den oben beschriebenen Pflanzentransformationsvektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (2) (1990), 221-230) ligieren zu können.

Sense-Primer:

CCG GGG TAC CAA GGA ATT TGT AGA TCT CCG A  
(SEQ ID Nr. 12)

Antisense-Primer:

5 CTA GTC TAG AAG CCT CCT AAA CCA AAC ATG A  
(SEQ ID Nr. 13)

In Figur 10a ist der erhaltene Vektor dargestellt.

Beispiel 5: Klonierung der vakuolären Pyrophosphatase (V-PPase) in den Transformationsvektor pBinAR

10 Folgende Primer wurden generiert, welche zu Beginn der 5'-UTR (Sense-Primer) und am Ende der 3'-UTR (Antisense-Primer) der Isoform I der V-PPase aus Zuckerrübe binden (Kim et al., Plant. Physiol. 106 (1994), 375-382):

15 Sense-Primer:

ACA CTC TTC CTC TCC CTC TCT TCC AAA CCC  
(SEQ ID Nr. 14)

Antisense-Primer:

20 TAG ATC CAA TCT GCA AAA TGA GAT AAA TTC C  
(SEQ ID Nr. 15)

Mit Hilfe dieser Primer wurde die V-PPase-Sequenz (bvpl) mittels PCR aus der oben beschriebenen Gesamt-cDNA heraus amplifiziert und das 2860 bp lange Amplifikat (SEQ ID Nr. 4) anschließend in den Vektor

25 tor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Groningen, Nieder-

lande) zwischenkloniert. Das erhaltene Amplifikat enthält den die Beta-V-PPase (BVP1) codierenden Bereich (SEQ ID Nr. 5).

Die links und rechts der Insertionsstelle befindlichen Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XbaI* des TOPO-Vektors wurden dazu genutzt, die Sequenz der V-PPase auszuschneiden und anschließend in die MCS des ebenfalls *KpnI/XbaI*-geschnittenen Pflanzen-transformationsvektor pBinAR zu ligieren. In Figur 10b ist der so erhaltene Vektor dargestellt.

Beispiel 6: Herstellung des Doppelkonstrukts durch Klonierung der Sequenzen von V-PPase und C-PPase in pBinAR

Die gesamte Expressionskassette der C-PPase wurde aus dem entsprechenden pBinAR-Konstrukt über PCR amplifiziert. Sie enthält neben der Vollängen-cDNA der C-PPase den CaMV35S-Promotor (540 bp) sowie den OCS-Terminator (196 bp). Der für die Amplifikation benutzte Sense-Primer bindet am 5'-Ende des CaMV35S-Promotors und besitzt eine *ApaI*-Schnittstelle, der Antisense-Primer greift am 3'-Ende des OCS-Terminators und verfügt eine *ClaI*-Schnittstelle (unterstrichen):

Sense-Primer:

AAG TCG GGG CCC GAA TTC CCA TGG AGT CAA AGA T  
(SEQ ID Nr. 16)

Antisense-Primer:

GAA GCC ATC GAT AAG CTT GGA CAA TCA GTA AAT TG  
(SEQ ID Nr. 17)

Das mittels dieser Primer gewonnene Amplifikat wurde mit *Apa*I und *Cla*I verdaut und anschließend in das ebenfalls *Apa*I und *Cla*I verdaute V-PPase/pBinAR-Konstrukt einligiert. Diese beiden Schnittstellen befinden sich hier zwischen dem OCS-Terminator und der rechten Grenzregion der T-DNA. Aufgrund der Position der Schnittstellen *Apa*I und *Cla*I befinden sich die beiden Expressionskassetten damit in umgekehrter Orientierung im pBinAR-Doppelkonstrukt. In Figur 10c ist der Doppelvektor dargestellt.

#### 15 Beispiel 7: Klonierung der V-PPase-Promotoren

Die Promotorsequenz (SEQ ID Nr. 6) der V-PPase-Isoform I (BSP1) wurde mittels einer genomischen DNA-Bank isoliert, die mit Hilfe des Lambda-ZAP-XhoI-Partial-Fill-In®-Vektorkits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) hergestellt worden war (Lehr et al., Plant Mol. Biol., 39 (1999), 463-475). Als Biotin-Sonde diente eine 569 bp lange Sequenz aus dem codierenden Bereich, die mittels degenerierter Primer hergestellt worden war:

25 Sense-Primer:

GGW GGH ATT GCT GAR ATG GC  
(SEQ ID Nr. 18)

Antisense-Primer:

AGT AYT TCT TDG CRT TVT CCC  
(SEQ ID Nr. 19)

Die Promotorsequenz (SEQ ID Nr. 7) der Isoform II  
5 (BSP2) wurde mittels „inverse“-PCR ermittelt. Aus  
Zuckerrübenblättern wurde genomische DNA nach dem  
Verfahren von Murray und Thompson (Nucl. Acids Res.  
8 (1980), 4321-4325) isoliert. Nach Verdau mit dem  
Restriktionsenzym *TaqI* wurden die Enden der Spalt-  
10 produkte ligiert, so dass zirkuläre DNA-Moleküle  
entstanden. Diese dienten in einer PCR als „Templa-  
te“, wobei der Sense-Primer aus dem 5'-nahen Be-  
reich der codierenden Region, der Antisense-Primer  
aus der 5'-UTR stammte:

15 Sense-Primer:

CCA AAA CGT CGT CGC TAA ATG TGC  
(SEQ ID Nr. 20)

Antisense-Primer:

ACC GGA ACC CTA ACT TTA CG  
20 (SEQ ID Nr. 21)

### Beispiel 8: Aktivität der V-PPase

#### a) Tonoplasten-Isolation

Tonoplasten aus Zuckerrüben wurden in Anlehnung an  
Ratajczak et al. (Planta, 195 (1995), 226-236) iso-  
25 liert. 45 g Rübenmaterial (4 Monate bei 4° C gela-  
gert) wurden in 160 ml Homogenisierungsmedium

(pH 8,0), 450 mmol/l Mannitol, 200 mmol/l Tricin, 3 mmol/l  $\text{MgSO}_4$ , 3 mmol/l EGTA, 0,5% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP), 1 mmol/l DTT) in einem Mixer zerkleinert. Das Homogenat wurde durch 200  $\mu\text{m}$ -Gaze  
 5 filtriert und anschließend 5 min bei 4200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Gewinnung der mikrosomalen Fraktion 30 min bei 300000 x g in einem Beckman®-50.2-Ti-Rotor zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden in 50 ml Homogenisie-  
 10 rungsmedium resuspendiert. Je 25 ml wurden mit 8 ml Gradientenmedium (5 mmol/l HEPES (pH 7,5), 2 mmol/l DTT und 25% (w/w) Saccharose) unterschichtet und 90 min bei 100000 x g zentrifugiert. Von beiden Gra-  
 15 dienten wurde jeweils 1 ml Interphase, welche die Tonoplastenfraktion repräsentiert, mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit Verdünnungsmedium (50 mmol/l HEPES (pH 7,0), 3 mmol/l  $\text{MgSO}_4$  und 1 mmol/l DTT) gemischt. Anschließend wurden die To-  
 20 noplasten 30 min bei 300000 x g pelletiert, in 500  $\mu\text{l}$  Lagermedium (10 mmol/l HEPES (pH 7,0), 40% Glycerol, 3 mmol/l  $\text{MgSO}_4$  und 1 mmol/l DTT) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei  $-80^\circ \text{C}$ .

#### b) Nachweis der Protonenpumpaktivität

25 Die Bestimmung der V-PPase-Protonenpumpaktivität erfolgte nach Palmgren (Plant Physiol., 94 (1990), 882-886). Eingesetzt wurde 50  $\mu\text{g}$  Tonoplastenprotein.

Ergebnisse:

Die Figuren 3a und 3b zeigen die  $H^+$ -Pumpaktivität in drei Monate gelagerten Rüben:

- Die spezifische Aktivität der V-ATPase ist etwa  
5 doppelt so hoch wie die der V-PPase.
- die vesikuläre Ansäuerung führt zu vergleichbaren pH-Gradienten.

Beispiel 9: Antiseren und Immunoblot-Analyse

10 Zum Nachweis der V-PPase-Proteine aus *Beta vulgaris* wurde ein gegen die V-PPase der Mungbohne (*Vigna radiata*) gerichtetes, polyclonales Antiserum aus Kaninchen verwendet (Maeshima und Yoshida, J. Biol. Chem., 264 (1989), 20068-20073). Zur Detektion der V-ATPase-Proteine wurde ein gegen das Holoenzym der  
15 vakuolären Adenosintriphosphatase (V-ATPase) von *Kalanchoe daigremontiana* gerichteter Antikörper aus Kaninchen eingesetzt (Haschke et al., In: Plant Membrane Transport, Herausgeber: Dainty, J., De Michelis, M. I., Marré, E. und Rasi-Caldogno, F.,  
20 1989, 149-154, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam).

Im Falle der C-PPase wurde ein polyklonales Antiserum aus Kaninchen benutzt, das von der Firma Eurogentec (Herstal, Belgien) hergestellt worden war.  
25 Als Antigen wurde dabei das rekombinante, über Ni-

NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigte Protein BSP1 injiziert.

Immunoblot-Analysen wurden wie bei Weil und Rausch beschrieben (Planta, 193 (1994), 430-437) durchgeführt. Abweichend davon wurde zur Blockierung statt 8% BSA 5% Magermilchpulver eingesetzt. Als Substrat wurde „SuperSignal West Dura®“ (Pierce, Rockford, USA) verwendet.

Zum Nachweis von V-PPase und V-ATPase wurden je 5 µg Protein der angereicherten Tonoplastenfraktion in einem nativen 12%igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Falle der C-PPase wurde je 0,5 g Blatt- und Rübenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörserst und das Homogenat direkt in 1 ml reduzierendem 2x Auftragspuffer (RotinLoad1, Roth, Karlsruhe) aufgenommen. Je 5 µl Rohextrakt (entspricht 2,5 mg Frischgewichtsäquivalenten) wurde in einem 15%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

## 20 Ergebnisse:

Figur 4 zeigt die Ergebnisse einer Westernblot-Analyse für BSP1:

- BSP1 ist sowohl in der Rübe als auch im Blatt vorhanden.

25 Figur 5 zeigt die Ergebnisse einer Westernblot-Analyse für die V-PPase:

- Die V-PPase kann in der Rübe von *Beta vulgaris* detektiert werden.

Beispiel 10: RNA-Extraktion und Northernblot-Analyse

5 *Beta vulgaris*-Suspensionskulturzellen wurden in „Gamborg B<sub>5</sub>“-Medium mit 2% Saccharose, unter Zugabe folgender Phytohormone angezogen: 0,2 mg/l Kinetin, 0,5 mg/l Naphtylelessigsäure (NAA), 0,5 mg/l Indol-3-Essigsäure (IAA) und 2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D).

10

Für die Stressexperimente wurden 6 Tage alte Zellen zunächst in frisches Medium überführt und nach zwei weiteren Tagen auf 0,9%ige Agarplatten übertragen, wo sie für 3 Tage belassen wurden. Die Platten

15 enthielten standardmäßig wie das Flüssigmedium Gamborg B<sub>5</sub>-Medium mit 2% Saccharose, jedoch zusätzlich noch 125 mmol/l Mannitol und 125 mmol/l Sorbitol. Unter Stressbedingungen wurden die Zellen auf Platten ohne Mannitol und Sorbitol, ohne Phytohormone,

20 ohne Saccharose, ohne Phosphat oder mit 100 mmol/l KCl bzw. NaCl angezogen.

Für die Untersuchungen an Keimlingen wurden *Beta vulgaris*-Samen (diploide Hybride, KWS, Einbeck) in Schalen mit feuchtem Sand ausgesät. Zum Schutz vor

25 Verdunstung wurden die Schalen mit einer Plastikhaube bedeckt und anschließend im Dunkeln bei 23° C aufbewahrt (Kontrollpflanzen keimten unter Licht

mit einem Hell/dunkel-Rhythmus von 12/12 h). Nach 6 Tagen wurden die im Dunkeln gekeimten Pflanzen dem Licht exponiert und ihr in Spitze (obere 0,5 cm) und Basis unterteiltes Hypokotyl sowie ihre Keimblätter zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 9 und 12 h nach Beginn der Belichtung geerntet. Um entwicklungsabhängige Effekte ausschließen zu können, wurde ein Teil der Pflanzen für weitere 24 h im Dunkeln belassen, bevor entsprechende Kontrollproben genommen wurden.

Um die entwicklungsabhängige Expression der V-PPase zu untersuchen, wurden Zuckerrüben unter Freilandbedingungen angezogen. Im Abstand mehrerer Wochen wurden Proben unterschiedlicher Gewebe genommen und bis zur Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die für das Verwundungsexperiment verwendeten Zuckerrüben wurden nach der Ernte 6 Monate bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Verwundung wurde nach Rosenkranz et al. (J. Exp. Bot., 52 (2001), 2381-2384) durchgeführt.

Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Logemann et al. (Analyt. Biochem., 163 (1987), 16-20) isoliert. Je 15  $\mu\text{g}$  RNA pro Spur wurde in einem 1,4%igen Agarosegel mit einem Formaldehydgehalt von 2% elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA per Kapillarübertragung auf eine Nylon-Membran (Duralon, Stratagene, Amsterdam) transferiert und durch UV darauf fixiert (Crosslinker®, Stratagene, Amsterdam). Die Detektion erfolgte mit-

tels Biotin-markierter Sonden nach Löw und Rausch  
 (In: Biomethods; A laboratory guide to biotin-  
 labelling in biomolecule analysis, Herausgeber:  
 Meier, T. und Fahrenholz, F., 1996, 201-213, Birk-  
 5 häuser Verlag, Basel).

Figur 6 zeigt eine Northernblot-Analyse von  
 V-PPase- und V-ATPase-Transkripten in verschiedenen  
 Geweben 6 Tage alter, etiolierter Zuckerrübenkeim-  
 linge, die im Anschluß an die Dunkelanzucht einer  
 10 unterschiedlich langen Belichtungsdauer (0, 3, 6, 9  
 bzw. 12 h) ausgesetzt worden waren. Zur Kontrolle  
 entwicklungsabhängiger Veränderungen wurden einige  
 Dunkelkeimer weitere 24 h, also insgesamt 7 Tage,  
 im Dunkeln gelassen, um ihre Transkriptmengen (Bahn  
 15 9 bzw. 15) mit denen der 6 Tage alten, vergeilten  
 Keimlinge ohne Lichtkontakt (Bahn 4 bzw. 10) ver-  
 gleichen zu können. Als weitere Kontrolle dienten 6  
 Tage alte Lichtkeimer, die unter einem 12/12 h  
 Licht/Dunkelheit-Rhythmus bei 160  $\mu\text{mol}$  Photonen pro  
 20  $\text{m}^2/\text{s}$  gewachsen waren (Bahn 3 und 16). Es wurden je-  
 weils 15  $\mu\text{g}$  RNA aufgetragen.

### Ergebnisse:

Figur 6 zeigt die Ergebnisse einer Northernblot-  
 Analyse zur Expression von V-PPase und V-ATPase in  
 25 Beta-Keimlingen.

- Unabhängig vom Belichtungsgrad ist die V-PPase  
 in Geweben mit hoher Teilungsrate (Hypoko-  
 tylspitze) oder Syntheseleistung (Kotyledonen)

stark exprimiert, während die Expression in ausdifferenzierten Geweben (Hypokotylbasis) niedrig ist.

- 5 • Die Untereinheiten der V-ATPase werden in den Keimblättern schwächer exprimiert als in der Hypokotylbasis, und zwar unabhängig vom Grad der Belichtung. Im teilungsaktiven Bereich der Hypokotylspitzen ist die Expression bei im Dunkel  
10 keln angezogenen, etiolierten Keimlingen hoch, nimmt aber bereits wenige Stunden nach Belichtung stark ab.

Die Figuren 7a und 7b zeigen die Ergebnisse einer Northernblot-Analyse der Effekte verschiedener Stressbehandlungen auf die Transkriptspiegel der  
15 vakuolären Pyrophosphatase (Isoform I und II) in Suspensionskulturzellen von *Beta vulgaris* L.

Die Figur 8 zeigt die Ergebnisse einer Northernblot-Analyse, aus der ein gegenläufiges Expressionsmuster von V-ATPase und V-PPase-Genen in  
20 *Beta*-Rüben nach Verwundung hervorgeht.

Schließlich zeigt die Figur 9 eine Northernblot-Analyse zur entwicklungsabhängigen Expression der vakuolären Pyrophosphatase (Isoform II = BVP2) in verschiedenen Geweben von *Beta vulgaris*.

Beispiel 11: Expression von V-PPase und C-PPase in  
*Arabidopsis thaliana*

Um den Einfluss der Überexpression der cytosolischen Pyrophosphatase (C-PPase) von *Beta vulgaris*,  
 5 der vakuolären Pyrophosphatase (V-PPase) von *Beta vulgaris* beziehungsweise der gleichzeitigen Überexpression beider Pyrophosphatasen auf das Wachstum, insbesondere das Rosettenwachstum, von *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen, wurden jeweils mit den  
 10 vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahren transgene *Arabidopsis*-Pflanzen bereitgestellt. Die dazu verwendeten pBinAR-Vektoren (Figur 10a-c) enthielten neben der Vollängen-cDNA der jeweiligen Pyrophosphatase auch den CaMV35S-Promotor. Die Überexpression der jeweiligen Pyrophosphatasen fand unter der Kontrolle dieses 35S-Promotors statt. Es wurde der Einfluss auf das Rosettenwachstum von *Arabidopsis thaliana* im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dabei wurden die Trockengewichte von sechs  
 15 Wochen alten Pflanzen bestimmt (Tabelle 3).  
 20

Tabelle 3:

<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>	Wildtyp	C-PPase sense	V-PPase sense	V-PPase & C-PPase sense
Gesamt-Sprosstrockengewicht (Rosette) [% (bezogen auf Wildtyp=100%)]	100 ± 6	112 ± 8	118 ± 11	126 ± 12

Ergebnisse:

Die Überexpression der Pyrophosphatasen in den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen führt zu einer signifikanten Steigerung des Gesamt-Sprosstrockengewichts (Rosette) dieser Pflanzen im Vergleich zum *Arabidopsis*-Wildtyp. Dabei zeigt die gleichzeitige Überexpression von beiden, sowohl der cytosolischen als auch der vakuolären Pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana* einen besonders starken Effekt auf das Gesamt-Sprosstrockengewicht; es wurde eine Steigerung um etwa 26% erreicht.

Die erfindungsgemäß erhältliche transgene Pflanze weist ein gesteigertes Wachstum in Folge vermehrter Meristemaktivität auf.

15 Beispiel 12: Expression von V-PPase und C-PPase in *Beta vulgaris*

Um den Einfluss der Überexpression der cytosolischen Pyrophosphatase (C-PPase) von *Beta vulgaris*, der vakuolären Pyrophosphatase (V-PPase) von *Beta vulgaris* beziehungsweise der gleichzeitigen Überexpression beider Pyrophosphatasen auf das Wachstum hauptsächlich der Speicherwurzel, insbesondere das Rübenfrischgewicht, von *Beta vulgaris* sowie auf den Saccharosegehalt im Rübenkörper zu untersuchen, wurden jeweils mit den vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahren transgene *Beta vulgaris*-Rüben bereitgestellt. Die dazu verwendeten Vektoren enthielten

neben der Vollängen-cDNA der jeweiligen Pyrophosphatase auch den CaMV35S-Promotor. Die Überexpression der jeweiligen Pyrophosphatasen fand unter der Kontrolle dieses CaMV35S-Promotors statt.

- 5 Es wurde der Einfluss auf das Rübenfrischgewicht, von *Beta vulgaris* im Vergleich zum *Beta vulgaris* Wildtyp 6 B 2840 untersucht (Tabelle 4).

Tabelle 4:

<b><i>Beta vulgaris</i></b>	Wildtyp 6 B 2840	C-PPase sense	V-PPase sense	V-PPase & C-PPase sense
Gesamt-Rübenfrischgewicht [% (bezogen auf Wildtyp=100%)]	100 ± 12	112 ± 13	114 ± 11	119 ± 13

- 10 Es wurde der Einfluss auf den Saccharosegehalt in der Rübe von *Beta vulgaris* im Vergleich zum Saccharosegehalt in der Rübe des *Beta vulgaris* Wildtyp 6 B 2840 untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5:

<b><i>Beta vulgaris</i></b>	Wildtyp 6 B 2840	C-PPase sense	V-PPase sense	V-PPase & C-PPase sense
Saccharosegehalt [Gew.-%]	16 ± 2	18 ± 2	19 ± 3	21 ± 3
Saccharosegehalt [% (bezogen auf Wildtyp=100%)]	100	112,5	118,75	131,25

Ergebnisse:

- Die Überexpression der Pyrophosphatasen in den transgenen *Beta vulgaris*-Rüben führt jeweils zu einer signifikanten Steigerung des Rübenfrischgewichts und des Saccharosegehalts dieser Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Dabei zeigt die gleichzeitige Überexpression von beiden, sowohl der cytosolischen als auch der vakuolären, Pyrophosphatase einen besonders starken Effekt auf das Rübenfrischgewicht und den Saccharosegehalt. Es wurde beim Rübenfrischgewicht eine Steigerung um etwa 19% erreicht. Gleichzeitig war der Saccharosegehalt auf einen Wert von etwa 21% erhöht, was eine Steigerung im Vergleich zum Wildtyp um etwa 31% entsprach.
- 15 Die erfindungsgemäß erhältlichen transgenen Rübenpflanzen weisen einen gesteigerten Saccharosegehalt und ein gesteigertes Wachstum in Folge erhöhter Meristemaktivität auf.

**Ansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung einer transgenen  
5 Zuckerrübenpflanze umfassend:

- 10 a) Transformieren mindestens einer Zucker-  
rübenzelle mit mindestens zwei Transgenen,  
wobei das erste Transgen für eine vakuoläre  
Pyrophosphatase (V-PPase) und das zweite  
Transgen für eine cytosolische und/oder  
kernlokalisierte lösliche Pyrophosphatase  
(C-PPase) codiert,
- 15 b) Kultivieren und Regenerieren der  
transformierten Zellen unter Bedingungen, die  
zur vollständigen Regeneration der transgenen  
Rübenpflanze führen, und
- 20 c) Erhalten einer transgenen Rübenpflanze mit  
gesteigertem Saccharosegehalt in der Rübe,  
gesteigerter und/oder verlängelter Meristem-  
aktivität und/oder verringerter Saccharose-  
abbaurate während der Lagerung.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das erste Transgen eine Nucleinsäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Nucleotidsequenzen bestehend aus

- 5      a) einer Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 4 , einer komplementären Sequenz davon,
- b) einer Nucleotidsequenz codierend die Aminosäuresequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 5, einer komplementären Sequenz davon und
- 10     c) einer Nucleotidsequenz, die mit der Sequenz nach a) oder b) eine Sequenzidentität von mehr als 80% aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das zweite Transgen eine Nucleinsäuresequenz umfasst,  
15     die ausgewählt ist aus der Gruppe der Nucleotidsequenzen bestehend aus

- a) einer Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 1 , einer komplementären Sequenz davon,
- 20     b) einer Nucleotidsequenz codierend die Aminosäuresequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 2, einer komplementären Sequenz davon und
- c) einer Nucleotidsequenz, die mit der Sequenz nach a) oder b) eine Sequenzidentität von mehr als 80% aufweist.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das erste und/oder zweite Transgen auf einem Vektor angeordnet ist.
- 5 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Vektor zur Überexpression des ersten und/oder zweiten Transgens ausgestattet ist.
- 10 6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das erste und/oder zweite Transgen auf dem Vektor operativ verknüpft zu einem Promotor vorliegt.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Promotor ein gewebespezifischer Promotor, ein konstitutiver Promotor, ein induzierbarer Promotor oder eine Kombination davon ist.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Promotor ein Promotor aus *Beta vulgaris*, *Arabidopsis thaliana* oder dem Blumenkohlmosaik-Virus ist.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Promotor der CaMV35S-Promotor ist.
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Promotor ein V-PPasepromotor aus *Beta vulgaris* ist.

11. Verfahren nach vorstehendem Anspruch, wobei der Promotor eine Nucleotidsequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Nucleotidsequenzen bestehend aus

- 5        a) einer Nucleotidsequenz nach SEQ ID Nr. 6 oder 7, einer komplementären Sequenz davon und
- b) einer Nucleotidsequenz, die mit einer der Sequenzen nach SEQ ID Nr. 6 oder 7 eine Sequenzidentität von mehr als 80% aufweist.

10      12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Promotor der Saccharose-synthasepromotor ist.

15      13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Promotor ein lagerungs-spezifischer Promotor ist.

14. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Vektor Intrans-Enhancer oder sonstige Regulationselemente aufweist.

20      15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das erste und zweite Transgen auf einem einzigen Vektor zusammen angeordnet sind.

16. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das erste und zweite Transgen auf verschiedenen Vektoren angeordnet sind.

17. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei erstes und zweites Transgen gleichzeitig transformiert werden.
- 5 18. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Transformation eine biolistische Transformation, eine Elektrottransformation, eine Agrobakterien-vermittelte Transformation und/oder eine Viren-vermittelte Transformation ist.
- 10 19. Transgene, vorzugsweise fertile, Pflanzen mit mindestens einer transformierten Zelle, erhalten nach einem Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche.
- 15 20. Transgene Pflanze nach vorstehendem Anspruch, gekennzeichnet durch einen gesteigerten Saccharosegehalt.
21. Transgene Pflanze nach einem der vorstehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch eine erhöhte Meristemaktivität während der Wachstums.
- 20 22. Transgene Pflanze nach einem der vorstehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch eine verringerte Abbaurate von Saccharose während der Lagerung.
- 25 23. Ernte- oder Vermehrungsmaterial einer transgenen Pflanze nach einem der vorstehenden Ansprüche.

24. Nucleinsäuremolekül codierend ein Protein mit der biologischen Aktivität einer löslichen Pyrophosphatase aus *Beta vulgaris*, insbesondere einer C-PPase, wobei die Sequenz des Nucleinsäuremoleküls ausgewählt ist aus der Gruppe der Nucleotidsequenzen bestehend aus:

- a) einer Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 1, einer komplementären Sequenz davon,
- b) einer Nucleotidsequenz codierend die Aminosäuresequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 2, einer komplementären Sequenz davon und
- c) einer Nucleotidsequenz, die mit der Sequenz nach a) oder b) eine Sequenzidentität von mehr als 80% aufweist.

25. Nucleinsäuremolekül codierend für einen Promotor einer vakuolären Pyrophosphatase (V-PPase) aus *Beta vulgaris*, wobei die Sequenz des Nucleinsäuremoleküls ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) einer Nucleotidsequenz nach SEQ ID Nr. 6 oder 7, eine komplementären Sequenz davon und
- b) einer Nucleotidsequenz die mit einer der Sequenzen nach SEQ ID Nr. 6 oder 7 eine Sequenzidentität von mehr als 80% aufweist.

26. Verwendung des Nucleinsäuremoleküls nach Anspruch 24 zur Herstellung einer transgenen Pflanze mit mindestens einer transformierten Zelle.

27. Vektor enthaltend die Sequenz des Nucleinsäuremoleküls nach Anspruch 24 und/oder 25.

28. Vektor nach Anspruch 27, der ein viraler Vektor oder Plasmid ist.

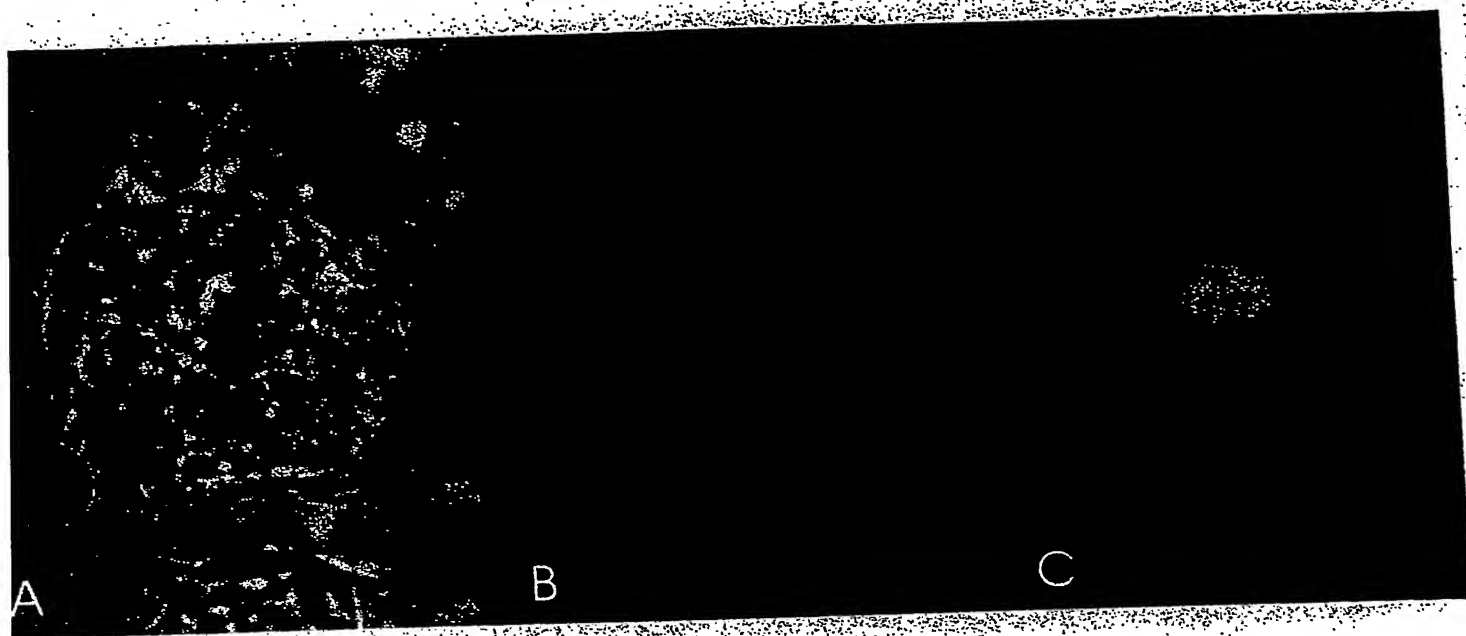
5 29. Verwendung des Vektors nach Anspruch 27 oder 28 zur Herstellung einer transgenen Pflanze mit mindestens einer transformierten Zelle.

30. Wirtszelle, transformiert mit einem Vektor nach Anspruch 27 oder 28.

10 31. Wirtszelle nach Anspruch 30, die eine bakterielle Zelle, pflanzliche Zelle oder tierische Zelle ist.

## **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Herstellung einer verbesserten Zuckerrübe, insbesondere einer Zuckerrübe, die einen gesteigerten Saccharosegehalt, eine verringerte Abbaurate von Saccharose während der Lagerung sowie ein verbessertes Wachstum aufweist. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung mindestens zweier Genkonstrukte zur Generierung einer solchen Pflanze sowie dabei eingesetzte Nucleotidsequenzen.



**FIG. 1**

### pH-Optimum

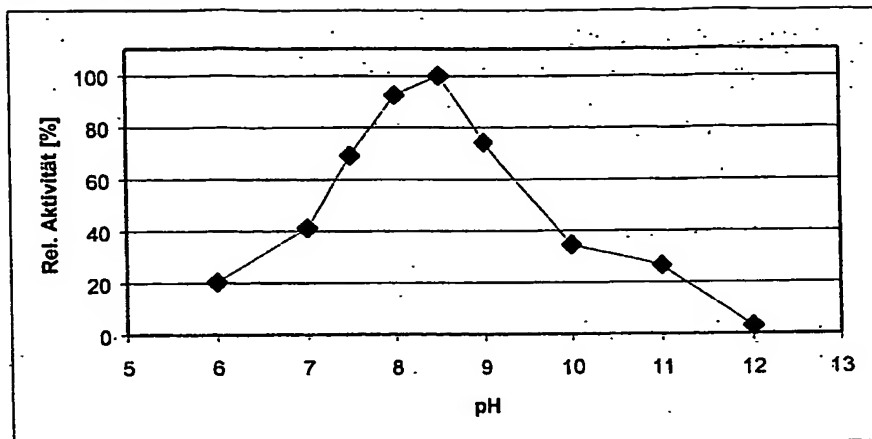


FIG. 2 A

### Temperatur-Optimum

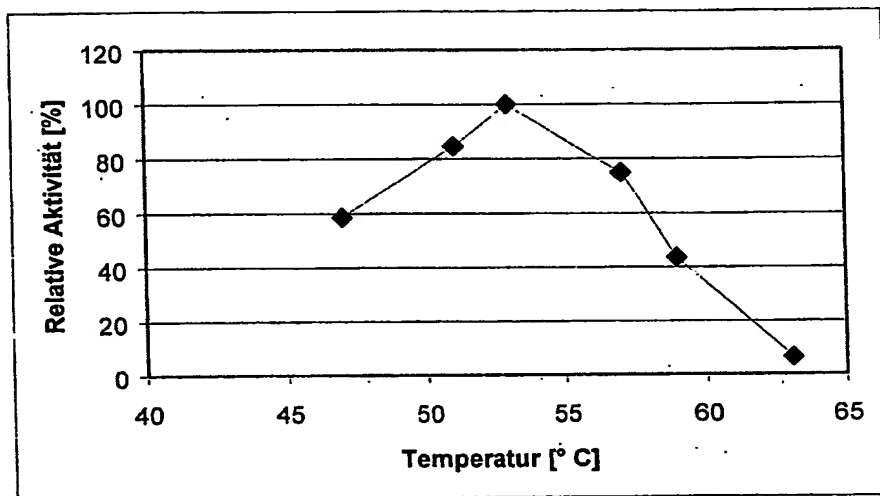


FIG. 2 B

### K<sub>m</sub>-Wert-Bestimmung

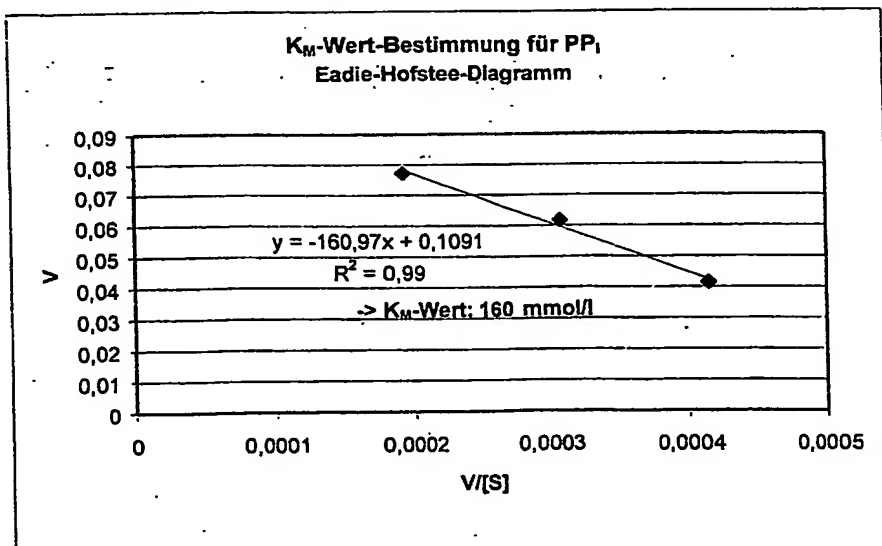
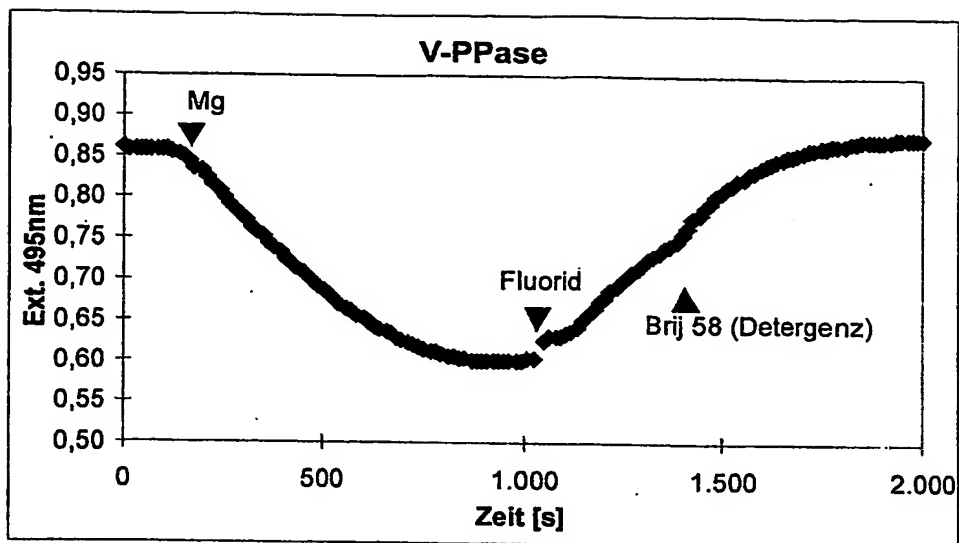
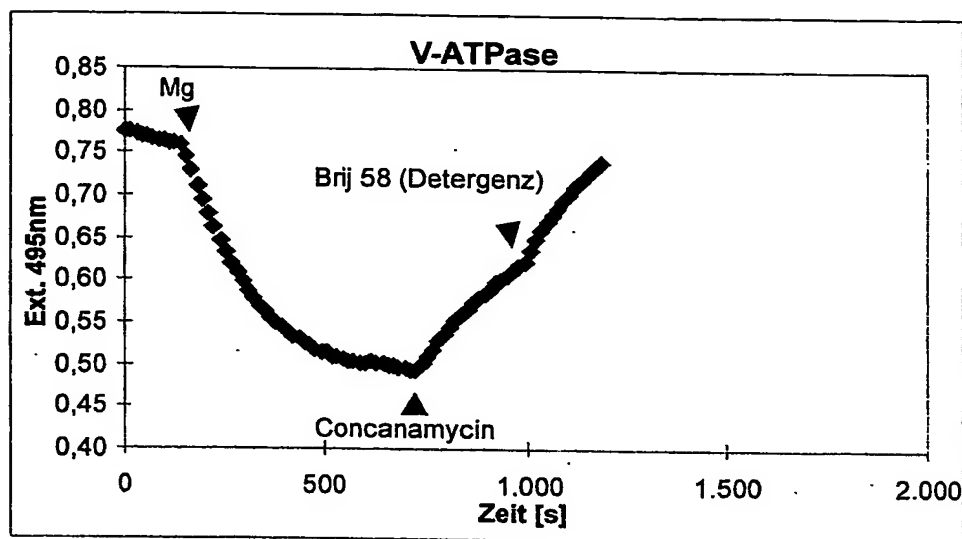


FIG. 2 C



**FIG. 3 A**



**FIG. 3 B**

Blatt Rübe Rekombinantes Protein [ng]  
(je 2,5mg FGA) 1000 100 10 1



FIG. 4

# Westernblot-Analyse: V-PPase in der Zuckerrübe

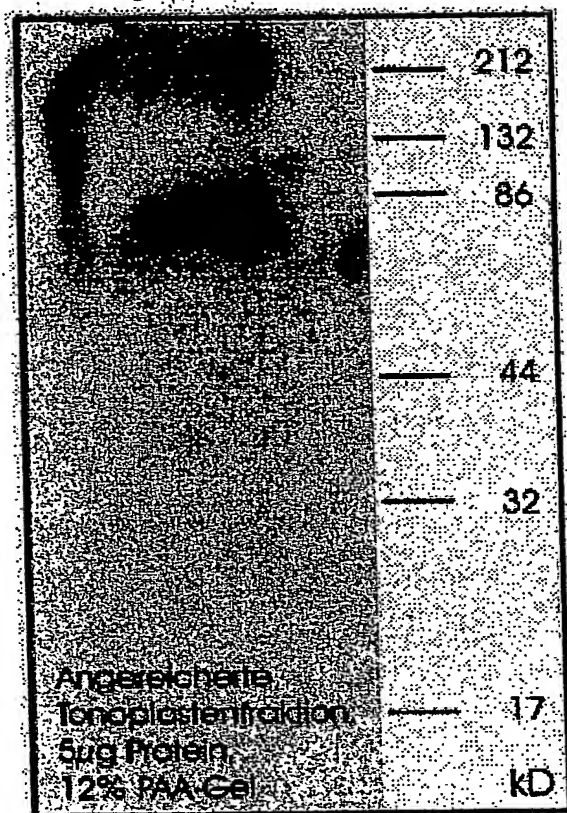


FIG. 5

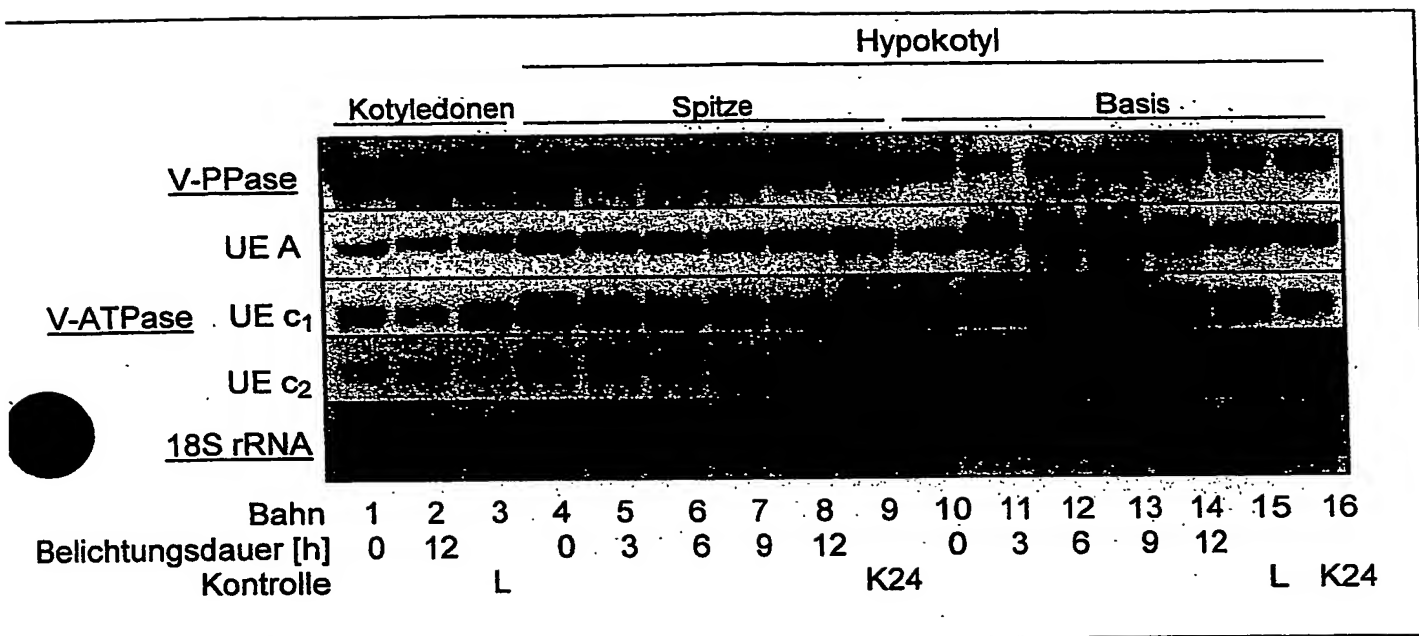


FIG. 6

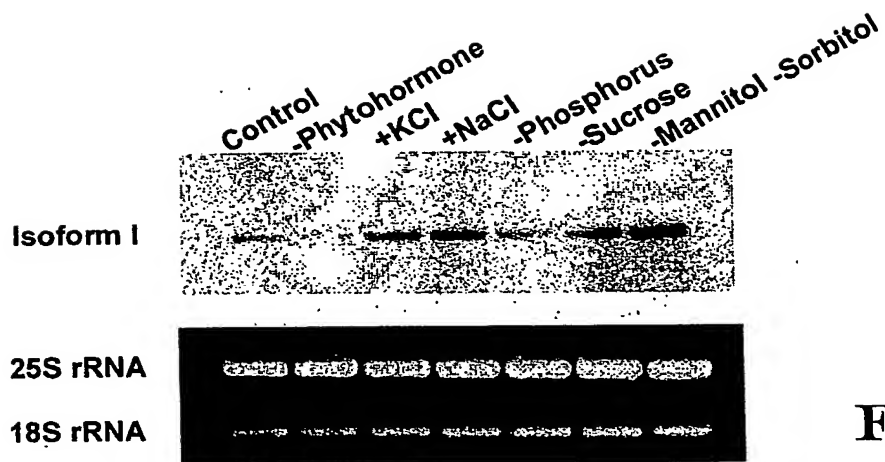


FIG. 7 A

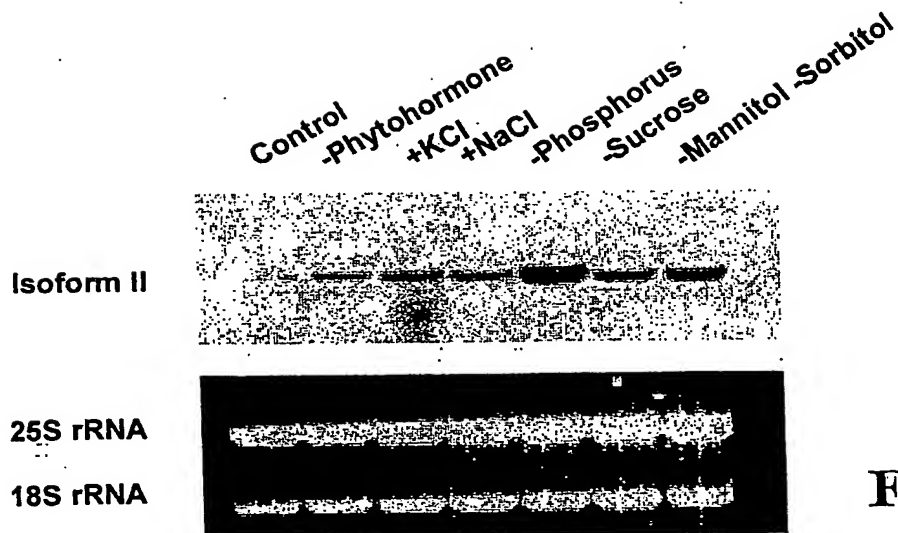
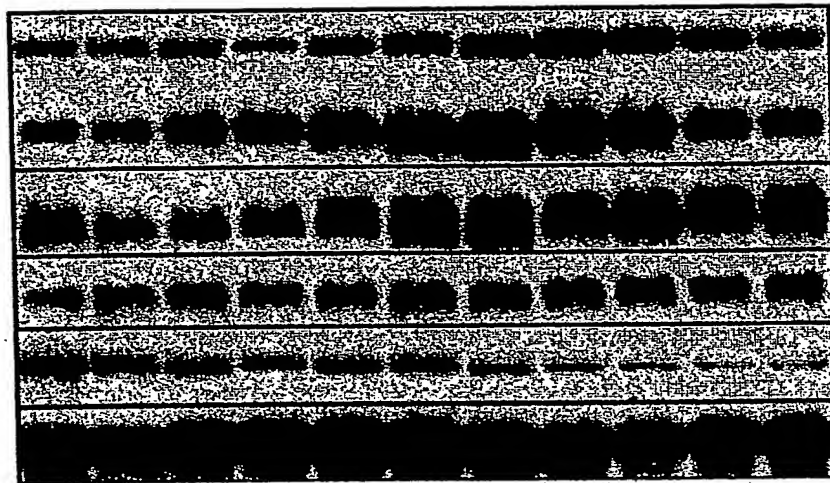


FIG. 7 B

5 µg total RNA per lane



V-ATPase UE A

V-ATPase UE c<sub>1</sub>

V-ATPase UE c<sub>2</sub>

V-ATPase UE E

V-PPase

18S rRNA

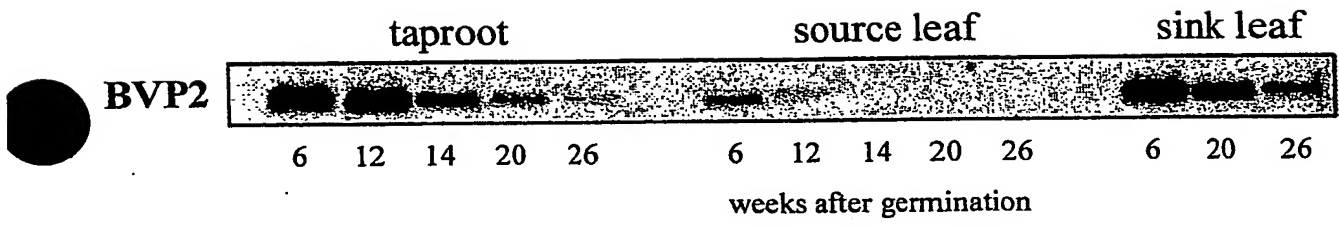
Stunden

Tage

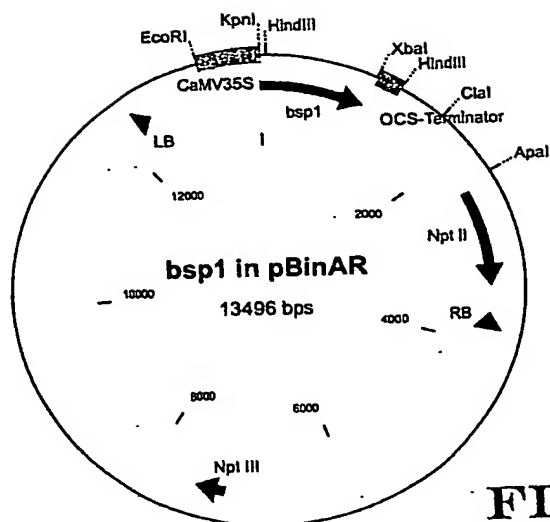
0 1 3 5 10 1 2 3 5 7 10

Zeit nach Verwundung

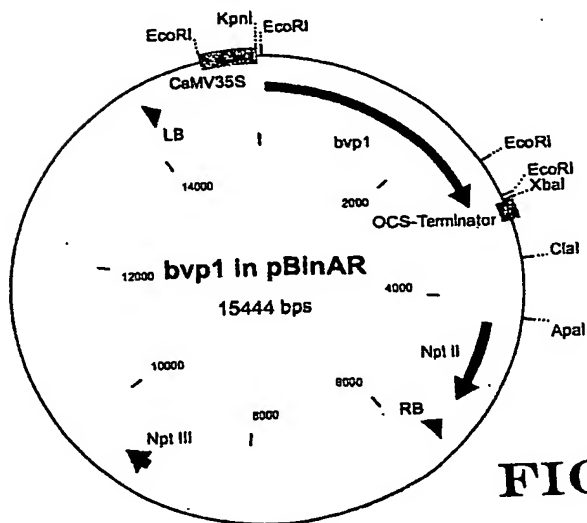
FIG. 8



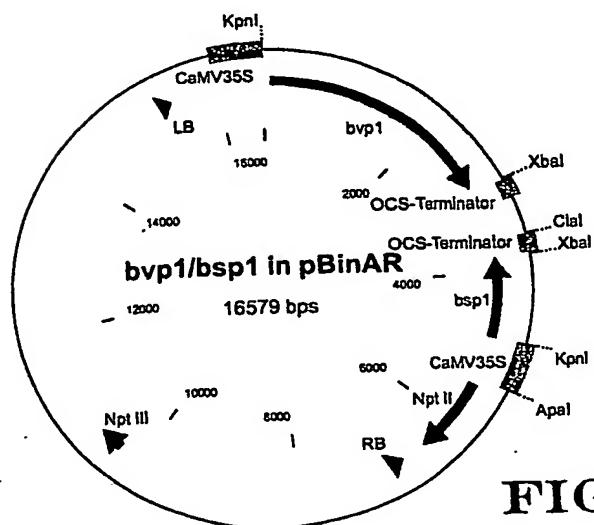
**FIG. 9**



**FIG. 10 A**



**FIG. 10 B**



**FIG. 10 C**

# SEQUENCE LISTING

<110> Südzucker Aktiengesellschaft Mannheim/Ochsenfurt

<120> Veränderte Expression in Zuckerrübe

<130> 17157

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1041

<212> DNA

<213> Beta vulgaris

<400> 1

```
attataaaaa .cccccaaaa tcaggagaag tttaaggaat ttgtagatct ccgattcttc      60
tgtattcggtt cattctaaaa gctttcgatt ttacgctctt cgctaatttt tctgaaacat      120
gatgaggag atgaatgctg ttgcgagat gaatgctgtt gcttctaaag taaaagaaga      180
gtatcgccga gctccgaagt tgaaccaaag gatcatttcg tcaatgtcaa ggagatctgt      240
tgcggcccat ccttggcatg atctcgagat tggacctaat gccoctgaaa tctgtaactg      300
tgttgttgag atacctaaag ggagcaaggt caagtatgag cttgacaaga aaactggact      360
tattatgggt gatcgaatat tatactcatc tgtgggtctat cctcacaact atggttttat      420
tccaagaaca ttgtgcgaag atggtgacct catggatgtt ttagtgctca tgcaggaacc      480
agtcgtccca ggctcgctttc ttcgagcccg ggcaattggt ttaatgccta tgattgatca      540
gggggagaaa gacgataaga taattgcagt ttgtgccgat gatcctgaag ttcgccatta      600
cactgatatc aaccagcttc ctccctcatcg tttggctgag atcagacgct tttttgagga      660
ctacaagaaa aatgagaaca aagaggttgc agtgaatgaa tttttgccag ctcaaattgc      720
tcatgatgcc atccagcact ctatggatct ctatgcggaa tacatcctac agacattgag      780
gagatgatga atggcacttt caattattgt cattcatatc ctgaagtaat attgaaggct      840
tttggtcaca ttgttacatc ttatttttgg tgctacctat ttaagagtcg atgttgaaaa      900
tcccaaaaga aagaaaagga gattttccct gttccttttc tgaatcttct tgtcgaaaat      960
tttatgtatt gtagtaaagc taaaacaatc ttcatgaact ttgaagttga gtttcctgta     1020
tcatgtttgg tttaggaggc t .                                         1041
```

<210> 2  
<211> 222  
<212> PRT  
<213> Beta vulgaris

<400> 2

Met Asp Glu Glu Met Asn Ala Val Ala Glu Met Asn Ala Val Ala Ser  
1 5 10 15

Lys Val Lys Glu Glu Tyr Arg Arg Ala Pro Lys Leu Asn Gln Arg Ile  
20 25 30

Ile Ser Ser Met Ser Arg Arg Ser Val Ala Ala His Pro Trp His Asp  
35 40 45

Leu Glu Ile Gly Pro Asn Ala Pro Glu Ile Cys Asn Cys Val Val Glu  
50 55 60

Ile Pro Lys Gly Ser Lys Val Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Lys Thr Gly  
65 70 75 80

Leu Ile Met Val Asp Arg Ile Leu Tyr Ser Ser Val Val Tyr Pro His  
85 90 95

Asn Tyr Gly Phe Ile Pro Arg Thr Leu Cys Glu Asp Gly Asp Pro Met  
100 105 110

Asp Val Leu Val Leu Met Gln Glu Pro Val Val Pro Gly Arg Phe Leu  
115 120 125

Arg Ala Arg Ala Ile Gly Leu Met Pro Met Ile Asp Gln Gly Glu Lys  
130 135 140

Asp Asp Lys Ile Ile Ala Val Cys Ala Asp Asp Pro Glu Val Arg His  
145 150 155 160

Tyr Thr Asp Ile Asn Gln Leu Pro Pro His Arg Leu Ala Glu Ile Arg  
165 170 175

Arg Phe Phe Glu Asp Tyr Lys Lys Asn Glu Asn Lys Glu Val Ala Val  
180 185 190

Asn Glu Phe Leu Pro Ala Gln Ile Ala His Asp Ala Ile Gln His Ser  
195 200 205

Met Asp Leu Tyr Ala Glu Tyr Ile Leu Gln Thr Leu Arg Arg  
210 215 220

<210> 3  
<211> 245  
<212> PRT  
<213> Beta vulgaris

<400> 3

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ser Ala Thr Met Asp  
1 5 10 15

Glu Glu Met Asn Ala Val Ala Glu Met Asn Ala Val Ala Ser Lys Val  
20 25 30

Lys Glu Glu Tyr Arg Arg Ala Pro Lys Leu Asn Gln Arg Ile Ile Ser  
35 40 45

er Met Ser Arg Arg Ser Val Ala Ala His Pro Trp His Asp Leu Glu  
50 55 60

Ile Gly Pro Asn Ala Pro Glu Ile Cys Asn Cys Val Val Glu Ile Pro  
65 70 75 80

Lys Gly Ser Lys Val Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Lys Thr Gly Leu Ile  
85 90 95

Met Val Asp Arg Ile Leu Tyr Ser Ser Val Val Tyr Pro His Asn Tyr  
100 105 110

Gly Phe Ile Pro Arg Thr Leu Cys Glu Asp Gly Asp Pro Met Asp Val  
115 120 125

Leu Val Leu Met Gln Glu Pro Val Val Pro Gly Arg Phe Leu Arg Ala  
130 135 140

Arg Ala Ile Gly Leu Met Pro Met Ile Asp Gln Gly Glu Lys Asp Asp  
145 150 155 160

Lys Ile Ile Ala Val Cys Ala Asp Asp Pro Glu Val Arg His Tyr Thr  
165 170 175

Asp Ile Asn Gln Leu Pro Pro His Arg Leu Ala Glu Ile Arg Arg Phe  
180 185 190

Phe Glu Asp Tyr Lys Lys Asn Glu Asn Lys Glu Val Ala Val Asn Glu  
 195 200 205

Phe Leu Pro Ala Gln Ile Ala His Asp Ala Ile Gln His Ser Met Asp  
 210 215 220

Leu Tyr Ala Glu Tyr Ile Leu Gln Thr Leu Arg Arg Val Asp Leu Gln  
 225 230 235 240

Pro Ser Leu Ile Ser  
 245

<210> 4  
 <211> 2810  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 4  
 cactcttcc tctccctctc ttccaaaccc tcttcattct ctctctctct ctctctctct 60  
 ctccctttatc ttcttcttct tcttcaattt tcttctccca ttttcaaaaa tcatgggtgc 120  
 agctcttctt ccagatctca taacagagat tatcattcct gtatgtgctg taattggaat 180  
 tgctttctct ctctttcaat ggtacatcgt ttctcagggtc aagctttccc ctgactctac 240  
 ccgcaataat aacaacaaaa atggattttc tgatagtttg attgaagaag aagaaggctt 300  
 taatgaccaa agtggtgttg ctaaatgtgc tgaaattcag aatgctattt ctgaaggggc 360  
 aacttccttc cttttcaccc agtaccagta tggttggtatc tttatggttg cttttgctgt 420  
 gttgatattc cttttcctcg gatctgtgga gggtttcagc acaagtagcc aggaatgtac 480  
 ctatgacaaa accaggagggt gcaagcctgc tcttgccact gctatcttca gcacagtggc 540  
 cttcttgctt ggcgctatca cttctttggg ttctgggttc ttcgggatga agattgccac 600  
 atacgcaa at gcccgaacaa cactagaggc tagaaagggt gtcggcaaag cattcattgt 660  
 agcatcagg tctggagctg tcatgggatt cctacttgct gcaaattggc ttttggtgct 720  
 ttacattact atccttctct tcaagattta ctatggtgat gactgggaag gtctgtttga 780  
 ggctataact gggtatggc ttggaggatc atccatggcc cttttcggta gagttgctgg 840  
 aggtatttac acaaaagctg ccgatgtggg tgctgatctt gtcggtaagg ttgaaagaga 900  
 catccctgag gatgaccca gaaatccagc tgttattgct gacaatgtcg gcgacaatgt 960  
 tggggatata gctgggatgg gttctgatct ttttgatcc tacgctgagt cgtcctgtgc 1020  
 tgctcttggt gttgcatcca tttcctcatt cgaaatttcc catgatttga cggcaatgat 1080  
 gtaccattg ttggttagct cggttggtat tattgtttgc ttgatcacia cttatttgc 1140

aaccgatttc ttcgagatca aggcgtgttaa ggagattgag cctgcactca agaagcagct	1200
aatcatctcc actgctctta tgactgtcgg agttgcagtt atttcttga ttgctcttcc	1260
tacttcattt accatttttg acttcggatc tcagaaggag gtgcagaact ggcaattggt	1320
tttatgtgtt gctgttgggt tgtgggctgg ctgtgcaaga tgttgctgat tcttgccgaa	1380
ctggagctgc caaaaatggt atttttggcc tggccttggg ttacaaatca gtcattattc	1440
ctatttttgc cattgctatc agcattttcg tcagtttttag ctttgcagct atgtatggta	1500
ttgctatggc tgctcttgggt atgctgagca ccattgccac tggattgggt attgatgcat	1560
atggccctat cagtataat gctggaggca ttgctgagat ggctggatatg agccacagaa	1620
tccgtgagag aactgatgcc ctgatgctg ctggaaacac aaccgctgct attggaaagg	1680
gttttgcaat cggttctgca gctcttgttt ctcttgctct ctttgggtgct tttgtaagcc	1740
gtgcatccat ccaaactgtg gatgtgttga ccccgaaagt attcattgggt ctcatgtgg	1800
agccatgct tccatactgg ttctctgcca tgacaatgaa gagtgtggga agtgcagctt	1860
tgaaaatggt tgaggaggtc cgaaggcaat tcaacacat ccctggcttg ctggaaggca	1920
ctgccaaacc cgactatgct acctgtgtca agatctccac tgatgcttcc atcaaggaga	1980
tgatcccccc aggtgctctt gtcagtctca caccattgat tgttggaacc ttctttgggt	2040
tcgaaactct gtctggcgtt ctgctgggt ctcttgctgc tgggtgtacag attgctattt	2100
ctgcatccaa cactgggtgtt gcttgggaca atgccaagaa gtacattgag gctggtgctt	2160
cagagcatgc aaggacactt ggtcccaagg gatcagatgc acacaaggca gctgtgatcg	2220
gtgacaccat cggtgacca cttaaggaca catcaggacc atcaactaac attctaata	2280
agcttatggc tgtcgagtca ctagtgttcg ccccttctt cgccaccac ggtggcttgc	2340
tcttcaagta cctctaaata tgatcggcgc aaaatcagaa ggcgacagag ggaggaattc	2400
gcggtttctt ctctcattt tgtcgcctac aaatcgggca agttttaaat tttatcgac	2460
aatttttgaa tgtcgttaga tgacaactac aaggctggag gggctaaaac ttctacatga	2520
tgatgatgat aatgataatt tggaagcaag tcttgtgaaa aatagagtta tatggtcaac	2580
attattcttt tcttttttct tctttttatt gtaagatcgg gattttagt aatcattttg	2640
caaacctctt ttgttaggta taactcattt tctattttag tcttcagaa attgcatgca	2700
gttgcccttt tattttctaa aaagagaacc tgttcttgag catgtgttgt aagggcagaa	2760
gtttctcatg tactttcttg gaatttatct cattttgcag attggatcta	2810

<210> 5  
<211> 764  
<212> PRT  
<213> Beta vulgaris

<400> 5

Met Gly Ala Ala Leu Leu Pro Asp Leu Ile Thr Glu Ile Ile Ile Pro  
1 5 10 15

Val Cys Ala Val Ile Gly Ile Ala Phe Ser Leu Phe Gln Trp Tyr Ile  
20 25 30

Val Ser Gln Val Lys Leu Ser Pro Asp Ser Thr Arg Asn Asn Asn Asn  
35 40 45

Lys Asn Gly Phe Ser Asp Ser Leu Ile Glu Glu Glu Glu Gly Leu Asn  
50 55 60

Asp Gln Ser Val Val Ala Lys Cys Ala Glu Ile Gln Asn Ala Ile Ser  
65 70 75 80

Glu Gly Ala Thr Ser Phe Leu Phe Thr Glu Tyr Gln Tyr Val Gly Ile  
85 90 95

Phe Met Val Ala Phe Ala Val Leu Ile Phe Leu Phe Leu Gly Ser Val  
100 105 110

Glu Gly Phe Ser Thr Ser Ser Gln Glu Cys Thr Tyr Asp Lys Thr Arg  
115 120 125

Arg Cys Lys Pro Ala Leu Ala Thr Ala Ile Phe Ser Thr Val Ala Phe  
130 135 140

Leu Leu Gly Ala Ile Thr Ser Leu Gly Ser Gly Phe Phe Gly Met Lys  
145 150 155 160

Ile Ala Thr Tyr Ala Asn Ala Arg Thr Thr Leu Glu Ala Arg Lys Gly  
165 170 175

Val Gly Lys Ala Phe Ile Val Ala Phe Arg Ser Gly Ala Val Met Gly  
180 185 190

Phe Leu Leu Ala Ala Asn Gly Leu Leu Val Leu Tyr Ile Thr Ile Leu  
195 200 205

Leu Phe Lys Ile Tyr Tyr Gly Asp Asp Trp Glu Gly Leu Phe Glu Ala  
210 215 220

Ile Thr Gly Tyr Gly Leu Gly Gly Ser Ser Met Ala Leu Phe Gly Arg  
225 230 235 240

Val Ala Gly Gly Ile Tyr Thr Lys Ala Ala Asp Val Gly Ala Asp Leu  
245 250 255

Val Gly Lys Val Glu Arg Asp Ile Pro Glu Asp Asp Pro Arg Asn Pro  
260 265 270

Ala Val Ile Ala Asp Asn Val Gly Asp Asn Val Gly Asp Ile Ala Gly  
275 280 285

Met Gly Ser Asp Leu Phe Gly Ser Tyr Ala Glu Ser Ser Cys Ala Ala  
290 295 300

Leu Val Val Ala Ser Ile Ser Ser Phe Glu Ile Ser His Asp Leu Thr  
305 310 315 320

Ala Met Met Tyr Pro Leu Leu Val Ser Ser Val Gly Ile Ile Val Cys  
325 330 335

Leu Ile Thr Thr Leu Phe Ala Thr Asp Phe Phe Glu Ile Lys Ala Val  
340 345 350

Lys Glu Ile Glu Pro Ala Leu Lys Lys Gln Leu Ile Ile Ser Thr Ala  
355 360 365

Leu Met Thr Val Gly Val Ala Val Ile Ser Trp Ile Ala Leu Pro Thr  
370 375 380

Ser Phe Thr Ile Phe Asp Phe Gly Ser Gln Lys Glu Val Gln Asn Trp  
385 390 395 400

Gln Leu Phe Leu Cys Val Ala Val Gly Leu Trp Ala Gly Leu Ile Ile  
405 410 415

Gly Phe Val Thr Glu Tyr Tyr Thr Ser Asn Ala Tyr Ser Pro Val Gln  
420 425 430

Asp Val Ala Asp Ser Cys Arg Thr Gly Ala Ala Thr Asn Val Ile Phe  
435 440 445

Gly Leu Ala Leu Gly Tyr Lys Ser Val Ile Ile Pro Ile Phe Ala Ile  
450 455 460

Ala Ile Ser Ile Phe Val Ser Phe Ser Phe Ala Ala Met Tyr Gly Ile  
465 470 475 480

Ala Met Ala Ala Leu Gly Met Leu Ser Thr Ile Ala Thr Gly Leu Ala  
485 490 495

Ile Asp Ala Tyr Gly Pro Ile Ser Asp Asn Ala Gly Gly Ile Ala Glu  
500 505 510

Met Ala Gly Met Ser His Arg Ile Arg Glu Arg Thr Asp Ala Leu Asp  
515 520 525

Ala Ala Gly Asn Thr Thr Ala Ala Ile Gly Lys Gly Phe Ala Ile Gly  
530 535 540

Ser Ala Ala Leu Val Ser Leu Ala Leu Phe Gly Ala Phe Val Ser Arg  
545 550 555 560

Ala Ser Ile Gln Thr Val Asp Val Leu Thr Pro Lys Val Phe Ile Gly  
565 570 575

Leu Ile Val Gly Ala Met Leu Pro Tyr Trp Phe Ser Ala Met Thr Met  
580 585 590

Lys Ser Val Gly Ser Ala Ala Leu Lys Met Val Glu Glu Val Arg Arg  
595 600 605

Gln Phe Asn Thr Ile Pro Gly Leu Leu Glu Gly Thr Ala Lys Pro Asp  
610 615 620

Tyr Ala Thr Cys Val Lys Ile Ser Thr Asp Ala Ser Ile Lys Glu Met  
625 630 635 640

Ile Pro Pro Gly Ala Leu Val Met Leu Thr Pro Leu Ile Val Gly Thr  
645 650 655

Phe Phe Gly Val Glu Thr Leu Ser Gly Val Leu Ala Gly Ser Leu Val  
660 665 670

Ser Gly Val Gln Ile Ala Ile Ser Ala Ser Asn Thr Gly Gly Ala Trp  
675 680 685

Asp Asn Ala Lys Lys Tyr Ile Glu Ala Gly Ala Ser Glu His Ala Arg  
690 695 700

Thr Leu Gly Pro Lys Gly Ser Asp Ala His Lys Ala Ala Val Ile Gly  
705 710 715 720

Asp Thr Ile Gly Asp Pro Leu Lys Asp Thr Ser Gly Pro Ser Leu Asn  
725 730 735

Ile Leu Ile Lys Leu Met Ala Val Glu Ser Leu Val Phe Ala Pro Phe  
740 745 750

Phe Ala Thr His Gly Gly Leu Leu Phe Lys Tyr Leu  
755 760

<210> 6  
<211> 1733  
<212> DNA  
<213> Beta vulgaris

<400> 6  
atcctccatc gattcacata ggatgtgaac cgttgatttt tttttttttt taaaaagttc 60  
agtgcaaaag ttagaaatta cttaaggcaa atcgctattt caattagcga ttttattaaa 120  
atagatcact aactgaagcc tgtttactat cattttttgt ttttagcttt caaaatttct 180  
aaaaactata aacaagatga taaaaaccac aaaaaatagt tttaagttat tagttttcaa 240  
aattgagaag actatatatt atagcaatga atacttttaa gtttattata ctgtttatat 300  
catatgactt ttaaaacccat caaccaaaaa ttgaaaatta atagtgatgt tgaacaaccc 360  
taagttagca ttttctattt tacaaaacca ctaactcgga tagcgattta attaagttaa 420  
accactaact caaaattagc ggtttaattc gggtacatca caaaccattc acataaact 480  
tgaacaatat tttctaaaat aaaaactaac ctaaaccgct aactcaatta gtgatgttga 540  
gagtattttt gtccttcttt aacctcacag ctaatggttt tgttcattat aagtgtcact 600  
tcaataaaat gattctcata gttatcttta aaaagtgttc ttttatgtta aaaacaatta 660  
agttcaatga cataaacgag attcgatccc acacaagact ttaccagtta agctatataa 720  
catccatcag tatctaaaaa gaagtcggta cctgacaatg acggtaaaaa agcaccttaa 780  
aaaagtaata ctatgtgaat ttaggttcct tatcaagcgc ttcagaaaca cctattatca 840  
atcaaagaaa taatagtaat aataataata ccaataaaaa taattaaaat gaattacaaa 900  
atataatact ccacctaatt ataatttact agaatttttt gcacgcgatg cgtgcttgaa 960

tttttttcga aaaagaaact cgattttttt cgacataaga gtcaaaattt gaacattaga	1020
caaacgaagt ataattttt ttagttgcaa aatttgattg gcttagtttc tatcacttat	1080
atctctcacc attctttttt ttttttatac ttttcaaagt taaattatat gaacaaaaga	1140
gaaattttat tgaattttatt tataattttt aatattataa ttttttagtt gatttttgaa	1200
ttaagtacag tactttataa attgtaaaga aagtgtacac tttgatttca agtcaatttt	1260
ttcataggtt gtagtttgta agtgaatttt tttgtttttg taaagtttat tcatttttagt	1320
gatttgcata acgtaaatta tgcaatttta tgatttttagt tgacttgtga gtgattgtta	1380
taattatatt tttggcattt ttgtttgaag ccacttttaa tttgtaagtg aatttgttat	1440
ttagaatgag aagggggtaa aatagacatt tcaaaatagg acaccattgc tcccccttcc	1500
cttatataat agagataagt agtaaataaa tagaaagtaa aaaccctca actttgagga	1560
gtacttacct taattaatat cccatttccc ttgtcaatcc tccctataaa acaaaaccca	1620
acttctcac actcttctc tccctctctt ccaaaccctc ctcatcttct ctctctctct	1680
cctttatctt cttcttcttc ttcaattttc ttctcccatt ttcaaaaatc atg	1733

<210> 7  
 <211> 962  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 7	
tcgaatttac aataatttat tttgcacata aaaattgacg ttgttgcgca taaattgaat	60
ataatataaa agattattga ctacatcaca taaaatctga ttatgagtga gttctttctt	120
cacctaaata acatgaactt atttaaactg acttattaaa cttattgat cttacttga	180
acgtatattt gagtattatc tcagacctga tcaattataa tcagactata tctgaactta	240
cttagacctaa aattttattt ttaagttgaa gagaatatac cttataattc atattaaaaa	300
attaactaca tatacaaaaa atgattattt aaaaaataat tatatcaaat aaaaacggac	360
tatattatac taaagctata tttagttcac ccgaattttt tgattagaac ttatgttttc	420
taatctgac tgatctgaac tgatctgatt acaagatctt atctttttaga tttttctcaa	480
tatataagaa aaaatataat catgtggggt cttgtttgat tcgtatcaat gagtacttta	540
ttcatgttca attattataa tttttactaa tacgtgaaga aagatattta atagtaataa	600
tgatttttaa atatgagcat gatctgaact gatttgatct gaactttttt tttatctgat	660
ctgaaataag taaaaataag ctcaactaaa catggcctaa gtataatttt caataaacia	720
cattaagtta ttatgaatgt aatccatttc aagttttttt taaaacccta ttacacctca	780

ccacacccaa taaaaacccg tcctaatttc tcctcactat aaaactaaaa acccactcca 840  
 ctctcttaca cacactccac actcaaattg tggtgtgtgc ttaactgtat tttctctgtt 900  
 gccggaattt cggcgatttt taggggtccg gcgtaaagtt aggggtccgg tgaagaaaaa 960  
 tg 962

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 8  
 tgctgctcat ccwtggca 18

<210> 9  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 9  
 tcrttyttct tgtartcytc aa 22

<210> 10  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 10  
 gtcgggatcc gccaccatgg atgaggagat gaatgctg 38

<210> 11  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 11  
 gaagctgcag gtcgactctc ctcaatgtct gtaggatg 38

<210> 12  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 12  
 ccgggggtacc aaggaatttg tagatctccg a 31

<210> 13  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 13  
 ctagtctaga agcctcctaa accaaacatg a 31

<210> 14  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 14  
 acactcttcc tctccctctc ttccaaaccc 30

<210> 15  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 15  
 tagatccaat ctgcaaatg agataaattc c 31

<210> 16  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 16  
 aagtcggggc ccgaattccc atggagtcaa agat 34

<210> 17  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 17  
 gaagccatcg ataagcttgg acaatcagta aattg 35

<210> 18  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 18  
 ggwgghattg ctgaratggc 20

<210> 19  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Beta vulgaris

<400> 19  
 agtayttctt dgcrttvtcc c 21

<210> 20  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Beta vulgaris

<400> 20  
ccaaaacgtc gtcgctaaat gtgc

24

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Beta vulgaris

<400> 21  
accggaaccc taactttacg

20

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**